

Aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe

Prof. Dr. O. Ortmann

der medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

Untersuchung der Rolle von *icb-1* im Kontext der östrogenvermittelten  
Genexpression und Proliferation anhand von Knockdown-Modellen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anna Konwisorz

2011



Aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe

Prof. Dr. O.Ortmann

der medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

Untersuchung der Rolle von *icb-1* im Kontext der östrogenvermittelten  
Genexpression und Proliferation anhand von Knockdown-Modellen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anna Konwisorz

2011

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Ortmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Charakterisierung des Gens icb-1 („induced by contact to basement membrane“)	7
1.2. Das Östrogensystem	9
1.2.1. Signalwege	9
1.2.2. Östrogenrezeptoren	11
1.2.3. Einfluss von Östrogenen auf die zelluläre Proliferation	13
1.2.4. Tumorthherapie mit Östrogenantagonisten	14
1.3. Zellzykluskontrolle und Rolle in der Tumorentstehung	16
1.4. Gynäkologische Tumoren	19
1.5. Krebszelllinien	23
1.6. Untersuchte Gene	24
1.7. Zielsetzung	26
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1. Material	28
2.1.1. Chemische Komponenten	28
2.1.2. Technische Komponenten und Geräte	33
2.1.3. Zelllinien	35
2.2. Methoden	35
2.2.1. Zellkultur	35
2.2.2. Molekulargenetische Methoden	38
2.2.3. Statistik	40
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1. Stabiler Knockdown von icb-1 in den Krebszelllinien SK-OV-3, HEC-1B und MCF-7	41
3.2. Auswirkungen des Knockdowns von icb-1 auf die Proliferation	42
3.2.1. Proliferation unter Standardbedingungen	42
3.2.2. Wachstumsverhalten in Reaktion auf 17- $\beta$ -Östradiol sowie PPT und DPN	44
3.3. Veränderung der Genexpression durch den Knockdown von icb-1	61
3.3.1. Genexpression unter serumhaltigen Kulturbedingungen (DMEM/F12 + 10%FBS)	61
3.3.2. Expression in serumfreiem Medium (DMEM/F12 + 1x SR2)	64
3.4. Einfluss des Knockdowns auf die durch Östradiol stimulierte Genexpression	67
3.5. Einfluss des Knockdowns von icb-1 auf die durch Tamoxifen stimulierte Genexpression bei MCF-7	71
<b>4. Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1. Hintergrund	75
4.2. Bestätigung der Rolle von icb-1 bei Differenzierungsprozessen	76
4.3. Bedeutung von icb-1 im Kontext zellulärer Proliferation und Östrogenresponse	78
4.3.1. SK-OV-3	78
4.3.2. MCF-7	81
4.3.3. HEC-1B	83
4.4. Gegenüberstellung der verschiedenen Zelllinien	86
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>93</b>

**8. Literaturverzeichnis**

**95**

**9. Danksagung**

**108**

# 1. Einleitung

## 1.1. Charakterisierung des Gens *icb-1* („induced by contact to basement membrane“)

Das humane Gen *icb-1*, auch *C1orf38* (chromosome 1 open reading frame 38), wird in einer Vielzahl an Geweben und Zelllinien exprimiert und zeigte in bisherigen Studien eine Verbindung zu zellulären Differenzierungsprozessen (Treeck *et al.* 1998 und 2002). Die genaue Funktion des Gens ist jedoch bisher ungeklärt. Außerdem bestehen kaum Übereinstimmungen zu anderen Genen (Treeck *et al.* 1998). Johnson *et al.* identifizierten *icb-1* allerdings kürzlich als Mitglied einer fünf Gene umfassenden Genfamilie, die als gemeinsames Merkmal eine globuläre Domäne, die so genannte CABIT-Domäne besitzt (Johnson *et al.* 2009). Sie beschrieben zudem ein mit *icb-1* verwandtes Gen, *C6orf190* oder *Themis*, das an der positiven Selektion von T-Lymphozyten beteiligt ist und hierbei mit dem zytoplasmatischen Adapterprotein Grb-2 interagiert (Johnson *et al.* 2009).

*Icb-1* wurde erstmals bei Experimenten zur In-Vitro-Differenzierung von Endometriumkarzinomzellen auf einer künstlichen Basalmembran entdeckt und charakterisiert (Treeck *et al.* 1998). Die entsprechende mRNA beziehungsweise die generierte cDNA hat eine Länge von 2366 Basenpaaren. Diese Sequenz besitzt einen signifikanten Open-Reading-Frame und ein Start-Codon an Position 129, sieben mutmaßliche Translations-Initiations-Codons sowie ein Stop-Codon an Position 981 (Treeck *et al.* 1998). Das durch den Open-Reading-Frame definierte Gen wurde *icb-1* (induced by contact to basement membrane) genannt. Aufgrund seiner Struktur ist das entsprechende Protein von 31,7 kD vermutlich im Zellkern lokalisiert (Treeck *et al.* 1998). Weiterhin existieren verschiedene Splicevarianten des *icb-1*-Transkriptes: Das ursprünglich entdeckte *icb-1α* sowie die Varianten *icb-1β* und *icb-1γ*. Zudem wurde eine Milz-spezifische Isoform - *icb-1δ* - identifiziert, die wahrscheinlich ein eng verwandtes Gen darstellt (Treeck *et al.* 2002).

5'

GACCACGCGTATCGATGTCGACCCACAGGATTGTACACAGAGGGCAGGGTGGTGAAGTACTGAGGACCAG 65  
CTCCTCATGCTTGAGGCTGTGGTGTATGCACCTCGGGATCCGCTCTGCCCCGCTGTGTCTGGGCAT 130

GGAGGGTCAGCAGGTCATCTGCACCTGCCCCATCCAGAAAGGGGCCCTTCTGGACATGGGAGC M 195  
E G Q Q V I L H L P L S Q K G P F W T W E

CTAGTCCCCCTCGAACTCTGCTCCAGGTCCTACAGGATCCAGCCCTGAAAGACCTCGTCTCACC 260  
P S A P R T L L Q V L Q D P A L K D L V L T

TGCCCCACCCTGCCCTGGCATTCCCTGATCTGCGGCCCCAGTATGAGATCCAAGCCATCATGCA 325  
C P T L P W H S L I L R P Q Y E I Q A I M H

CATGCGCAGGACCATTGTCAAGATCCCTTCTACCCCTGGAGGTCGACGTGGAGGACGTCACCGCCT 390  
M R R T I V K I P S T L E V D V E D V T A

CCTCCCGGCACGTCCACTTTATCAAACCGCTGCTGCTGAGCGAGGTCCTGGCCTGGGAAGGCCCT 455  
S S R H V H F I K P L L L S E V L A W E G P

TTCCCCCTGTCCATGGAGATCCTGGAGGTTCTGAGGGCCGCCCATCTTCTCAGCCCGTGGGT 520  
F P L S M E I L E V P E G R P I F L S P W V

GGGCTCCTTGCAAAAAGGCCAGAGGCTTTGCGTCTATGGCCTAGCCTCACCACCCTGGCGGGTCC 585  
G S L Q K G Q R L C V Y G L A S P P W R V

TGGCCTCAAGCAAGGGCCGCAAGGTGCCCAGGCACTTCTGGTGTGAGGGGGCTACCAAGGCAAG 650  
L A S S K G R K V P R H F L V S G G Y Q G K

CTGCGGCGGGCGGCCAAGGAGTTCCCCACGGCCTATGACCTCCTAGGTGCTTTCCAGCCAGGCCG 715  
L R R R P R E F P T A Y D L L G A F Q P G R

GCCACTCCGGGTGGTGGCCACAAAGGACTGTGAGGGCGAGAGGGAGGAGAATCCCGAGTTCACGT 780  
P L R V V A T K D C E G E R E E N P E F T

CCCTGGCTGTGGGTGACCGGCTGGAGGTGCTGGGGCCTGGCCAGGCCCATGGGGCCAGGGCAGT 845  
S L A V G D R L E V L G P G Q A H G A Q G S

GACGTGGATGTCTTGGTTTGTGACGCGCTGAGTGACAGGCTGGGGAAGATGAGGAGGAAGAGTG 910  
D V D V L V C Q R L S D Q A G E D E E E E C

CAAAGAGGAGGCAGAGACCCAGAGCGGGTCTGCTGCCCTTCCACTTCCCTGGCAGTTTCGTGGA 975  
K E E A E T Q S G S C C P S T S L A V S W

GGAGATGAGTGACAGCCGGCGCTACAGCCTGGCAGATCTGACTGCCCAGTTTTCAATGCCTTGTG 1040  
R R \*

AGGTCAAGGTGGTGGCCAAGGACACCAGCCACCCCAATGACCCTCAGAACCTCCTTCTGGGCCT 1105  
GCGGCTGGAGGAGAAGATCACAGAGCCATTCTTGGTGGTGAGCCTGGACTCTGAGCTGGGATGTG 1170  
CTTTGAGATCCCTCCCCGGAGGCTGGACCTGACTGTCTGAGGGCCAAGGGGCAGCCAGACTTGC 1235  
CAGAGGGGTCTCTCCCCATAGCCACAGTGGAGGAAGCTGGAACAGACACCTTTTATTATTGTCTT 1300  
CGGAAGTTACCAGCCTGTGAGATCCAAGCCCCCCCCACCCAGGCCCCCTAAAAATCAGGGCCTCAG 1365  
CAAGCAGAGGAGACACAGCAGTGGAGGAGGCGTCAAGTCTTCAAGTCTTAGGATTGCAGCAAC 1430  
ACGTTGCGGCTGCCCAACCCCAAGGCGAAGACCTTGCCAGAGTTCATCAAGGATGGCTCCAGTACG 1495  
TACAGCAAGATTCTGCCCACAGGAAGGGCCACAGGCCCCGCTAAGCCCCAAGGCAGGATCTAGA 1560  
TGATGATGAACATGATTATGAAGAAATACTTGAGCAATTCAGAAAACCATCTAAGTGCTGGAGG 1625  
AACCAGCTTCTTAAGTGTCTTCTCAGGGAATCCGACACCAGCCAACCATTTTAAGCCTCTAA 1690  
AAGACCTCGGGCAAGTCTCACAGAACTGAGCTGCAGACGGGGAGTAGCTTTGTGGAACTGATT 1755  
TGATGGACACTGCACCAAGCTTCTTCAGGTTCTAGATTCTTGCTACTTAGGGCGGGCTGGTTTGG 1820  
ACCTAACATCTCGCACGTGACTCCCTCAGCCTCAGAGCCTTGGGATGCAGAGCAGCTGGCAGGGT 1885  
TCCTCTCAATCCTGCAACCCAGCTGTCCACCGGTGGATGCAGAGGGGAATCCGAGGCCATCAA 1950  
CCTTGGTGACAGCAGCGCAGTGCCAATGCTGATCACACTGCATGGGAGATTTTGTAAACGTCTGC 2015  
CACCCCCACTCTCACCCCCAAGCTTAAGCCCCCGGAGGCGCTGGACTGTCTTCTCATCTCTGT 2080  
AGCACCAAGCCTGATAGATCTGTATATGGTAAACAGGGGTTTAACCACATGTGGTTAACATGGAT 2145  
TAATGTGGGAATTTGGCTTCAAGAACACAACTTAGGACCTTGGGCCCCAAAAGCTGGTGGTGAA 2210  
ATGAGAGGAGCCAATTTAAGAAGACCCTTATGGAGACCTGAGGCTGCAGAACTGGTAGGTTTCA 2275  
TCAGGTGGTTAAAGTCGTCAAAGTTGTAAGTACTAACCAAGATTATTTCAATTTTAAACCACAG 2340  
AATAAAAATGACACCTGAGCTTCTCC poly A 3'

**Abb. 1** Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des humaner *icb-1*-cDNA. Raute: Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C. Dreieck: Phosphorylierungsstelle für Caseinkinase II. Quadrat: N-Myristoylierungsstelle. Kreis: Amidierungsstelle. Kasten: Nuclear-Targeting-Patterns. Fett: Polyadenylierungssignal. (aus Treeck et al. 1998, S.428)

Die Transkription des *icb-1*-Gens wird bei verschiedenen Differenzierungsprozessen induziert. Dies konnte zunächst, wie bereits erwähnt, durch den Stimulus einer künstlichen Basalmembran nachgewiesen werden (Treeck *et al.* 1998). Weiterhin ist *icb-1* an In-Vitro-Differenzierungsprozessen von promyelozytischen Leukämiezellen in monozytische und granulozytische Zellpopulationen beteiligt. In HL-60-Zellen wurde die Transkription von *icb-1* sowohl durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das die Differenzierung zu Monozyten bewirkt, als auch bei der Granulozytendifferenzierung durch ATRA (All-trans-Retinoic Acid) deutlich gesteigert (Treeck *et al.* 2002). Interferon- $\gamma$ , das neben seiner antiviralen Wirkung auch das Tumorstadium hemmt, ist ebenfalls in der Lage, die Expression von *icb-1* in verschiedenen Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien zu induzieren. Die erhöhte *icb-1*-Expression wiederum hemmt die antiproliferative Wirkung dieses Zytokins (Treeck *et al.* 2005).

Zusätzlich zu dieser Rolle des Gens bei Differenzierungsprozessen spielt *icb-1* offenbar eine Rolle im Östrogensystem. Im Jahr 2008 wurde ein verändertes Östrogen-Response-Element (ERE) in der Promotorregion von *icb-1* identifiziert und ein Zusammenhang zwischen *icb-1* und der zellulären Antwort auf  $17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$  nachgewiesen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Expression von *icb-1* in Mamma- und Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit von Östrogenrezeptor alpha ( $\text{ER}\alpha$ ) induziert (Bollmann *et al.* 2008). Weitere Untersuchungen zur Rolle von *icb-1* im Östrogensystem sind daher von großem Interesse um seine Funktion besser verstehen zu können.

## **1.2. Das Östrogensystem**

Östrogene nehmen im menschlichen Fortpflanzungssystem eine wichtige Stellung bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung ein (Yashwanth *et al.* 2005). Sogar Krebszellen, die aus hormonabhängigen Geweben hervorgegangen sind, bleiben bis zu einem gewissen Zeitpunkt im Prozess der Dedifferenzierung östrogensensibel. Auch die entsprechenden Rezeptoren,  $\text{ER}\alpha$  und  $\text{ER}\beta$ , die die hormonellen Signale aufnehmen und die zelluläre Reaktion darauf vermitteln, können sowohl physiologisch in sexualhormonsensiblen Zellen als auch in Krebszelllinien nachgewiesen werden (Villalobos *et al.* 1995; Yashwanth *et al.* 2005; Peng & Jordan 2008, S.189).

### **1.2.1. Signalwege**

Die physiologischen Effekte des lipophilen Steroidhormons  $17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$  auf hormonsensible Gewebe können nach heutigen Erkenntnissen über unterschiedliche Signalwege vermittelt werden. Zum Einen kann das Hormon gebunden an dimerisierte Östrogenrezeptoren über eine direkte Bindung an Estrogen-Responsive-Elements (EREs)

die Expression bestimmter Gene beeinflussen. Außerdem spielt die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. Schließlich kristallisierte sich in den letzten Jahren ein weiterer - von Vorgängen im Zellkern unabhängiger - Mechanismus heraus, bei dem die Östrogenwirkung über membrangebundene Rezeptoren vermittelt wird (Rae & Johnson 2005; Kleuser *et al.* 2008; Peng & Jordan 2008, S.198).

Der klassische Weg der Signaltransduktion ist abhängig vom Liganden Östrogen. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor löst eine Konformationsänderung aus. Hierdurch werden inhibitorische Heatshock-Proteine (Hsp70 und Hsp90) abgespalten. Nach der Translokation in den Nukleus und der Dimerisation zweier Rezeptoren folgt die Bindung an Östrogen-responsive Elemente (ERs) in den Promoterregionen der durch Östrogen regulierten Gene. Die Aktivierung der Transkription dieser Zielgene erfordert jedoch zusätzlich das Zusammenwirken verschiedener Co-Aktivatoren (Krauss 2003, S.172; Simoncini *et al.* 2004; Peng & Jordan 2008, S.193;).

Auch unabhängig von östrogenresponsiven Elementen (ERs) sind die Östrogenrezeptoren in der Lage, die Expression von Zielgenen zu stimulieren oder zu hemmen. Dies geschieht durch direkte Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an alternative Sequenzen in der Promotorregion des jeweiligen Gens oder aber indirekt mittels Mediator-Proteinen wie AP-1 (Aktivator-Protein 1), einem Heterodimer aus JUN und FOS, oder dem Transkriptionsfaktor Sp1 (Krauss 2003, S.172; Peng & Jordan 2008, S.196). An diesem Punkt bestehen Verbindungen zu Signalisierungsketten anderer Transkriptionsfaktoren, die die Genaktivierung mit beeinflussen (Peng & Jordan 2008, S.196).

Doch sogar in Abwesenheit von Östradiol kann der ER durch den Einfluss anderer Signalwege („crosstalk“) aktiviert werden. Dies erfolgt zum Einen mittels Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in den AF-1- und AF-2-Domänen des Rezeptors, unter Anderem durch Kinasen der MAPK-Kaskade (Krauss 2003, S.170). Dadurch werden die Dimerisation und die Bindung von Coaktivatoren oder Corepressoren verändert. Eine weitere Möglichkeit ist die Phosphorylierung ebendieser modulierender Proteine (Krauss 2003, S.170; Peng & Jordan 2008, S.197). Signalwege, die auf diese Weise in die ER-Wirkung eingreifen, stehen beispielsweise unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, IGF-1 oder Insulin und Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Krauss 2003, S.170; Kleuser *et al.* 2008; Peng & Jordan 2008, S.197). Diese Verbindung zwischen ER und Wachstumsfaktor-Signalwegen soll mitverantwortlich sein für die zelluläre Resistenzentwicklung gegenüber endokrinen Therapeutika in der Brustkrebstherapie (Peng & Jordan 2008, S.198).

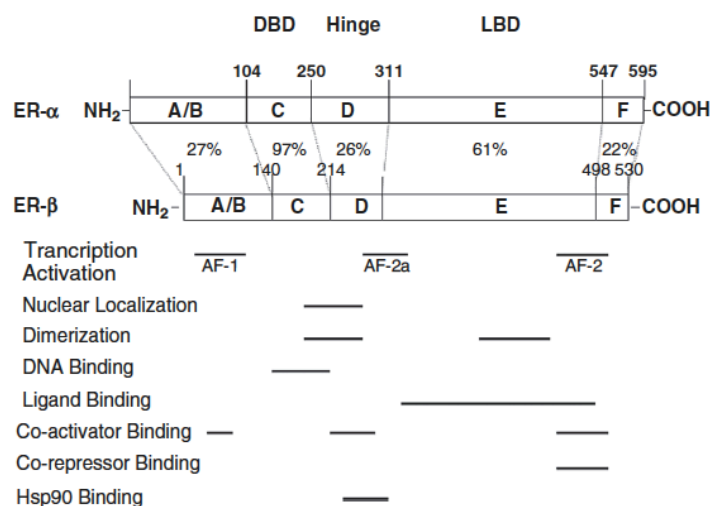
Zusätzlich zu diesen genomischen Wirkungen des Hormons wurde kürzlich ein weiterer Mechanismus der Östrogenwirkung identifiziert. Dieser vermittelt eine schnelle zelluläre Wirkung des Steroidhormons, die folglich unabhängig von der Transkription responsiver Gene ist. Sie erfolgt über Second Messenger wie Kalzium, cAMP, Phosphatidylinositol oder NO (Simoncini *et al.* 2004; Guo *et al.* 2006; Peng & Jordan 2008, S. 198). Die Signaltransduktion soll dabei über einen membrangebundenen ER erfolgen. Potentielle Kandidaten hierfür wären entweder die regulären Rezeptoren ER $\alpha$  oder ER $\beta$ , die jedoch keine Transmembrandomäne besitzen und mittels anderer Moleküle an der Zellmembran verankert sein müssten, oder allerdings einer der neu entdeckten „alternativen Östrogenrezeptoren“. Hierbei sind der ER-X in Neuronen oder der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 zu nennen (Thomas & Dong 2006; Albanito *et al.* 2008; Kleuser *et al.* 2008; Peng & Jordan 2008, S.199). GPR30 war in letzter Zeit Gegenstand verschiedener Studien und scheint tatsächlich eine wichtige Rolle in der Vermittlung östradiolgesteuerter Funktionen zu haben, die bisher nicht mit der Wirkung der nukleären Rezeptoren erklärt werden konnten. Er beeinflusst über die Aktivierung von MAP-Kinasen die Funktion des Smad-Proteins und übt hierüber Einfluss auf den TGF- $\beta$ -Signalweg aus (Kleuser *et al.* 2008). Auch die Transaktivierung des EGFR scheint durch GPR30 vermittelt zu sein (Rae & Johnson 2005). EGF wiederum ist vermutlich in der Lage, die Expression von GPR30 zu aktivieren und so die Östradiol-abhängige Proliferation zu stimulieren (Albanito *et al.* 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GPR30 nach Bindung von Östradiol einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels und des Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat bewirkt (Revankar *et al.* 2005). Interessanterweise zeigt sowohl der SERM 4-OH-Tamoxifen als auch die als reiner Östrogenantagonist bekannte Substanz ICI 182, 780 an diesem Rezeptor eine agonistische Wirkung (Thomas *et al.* 2005). Die Lokalisation des Rezeptors wird von verschiedenen Studien unterschiedlich angegeben - einerseits an der Plasmamembran, andererseits am Endoplasmatischen Retikulum (Rae & Johnson 2005). Die genaue Funktionsweise und Wirkung des neuen Rezeptors ist bisher bei Weitem noch nicht vollständig geklärt, nichtsdestoweniger stellt GPR30 einen interessanten Kandidaten für die Vermittlung schneller zellulärer Östrogenwirkungen dar.

### **1.2.2.Östrogenrezeptoren**

Nicht nur an den verschiedenen alternativen Östrogensignalwegen, auch an der Charakterisierung der Östrogenrezeptoren wird noch intensiv geforscht, wie schon an der Diskussion über GPR30 deutlich wird. Neben dem schon länger bekannten, klassischen ER $\alpha$  wurde 1996 der Rezeptor ER $\beta$  entdeckt, der wiederum Subtypen besitzt. Zusätzlich wird, wie oben erwähnt, über potentielle Kandidaten für eine membrangebundene Östrogenrezeptorform diskutiert. Doch auch die schon besser verstandenen Rezeptoren

ER $\alpha$  und die verschiedenen ER $\beta$ -Subtypen unterscheiden sich strukturell deutlich. Zudem werden ihnen teils abweichende Funktionen zugeschrieben.

Die zugehörigen Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen (Tremblay *et al.* 1997; Peng & Jordan 2008, S.190) und bereits die Differenzen im Molekulargewicht von 67 kD im Falle des ER $\alpha$  beziehungsweise 54k D bei ER $\beta$  deuten auf Unterschiede hin. Die Affinität zum Liganden ist jedoch für ER $\alpha$  und die am häufigsten vertretene Unterform des ER $\beta$  vergleichbar (Peng & Jordan 2008, S.190). Beide fungieren wie alle Steroidhormonrezeptoren als liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und entsprechen sich im prinzipiellen strukturellen Aufbau (Howell 2006). Sie lassen sich in Abschnitte unterschiedlicher Funktion unterteilen: Die A/B-Region, auch als „activation function-1“ (AF-1) bezeichnet, die C-Region als DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Hinge-Region D, sowie die für die Ligandenbindung zuständige E-Region und die C-terminale F-Region, wobei letztere zusammen auch die AF-2-Region umfassen (Krauss 2003, S.156; Peng & Jordan, S.190). Am stärksten konserviert ist hierbei der Aufbau der DNA-Bindungs-Domäne, die eine Homologie von 97% zeigt (Tremblay *et al.* 1997). Andere Bereiche jedoch weisen deutliche Unterschiede auf, so beispielsweise die A/B-Region, in der beide Rezeptortypen nur 27% der Aminosäuren teilen (Peng & Jordan 2008, S.190). Dies wirkt sich beispielsweise auch auf die Aktivität der entsprechenden AF-1-Domäne aus, die bei ER $\beta$  weitaus weniger in der Lage ist, entsprechende Promotoren zu aktivieren (Cowley & Parker 1999). Beide Rezeptortypen können Heterodimere bilden, jedoch auch als Homodimere vorliegen (Cowley *et al.* 1997, Peng & Jordan 2008, S.191).



**Abb. 2** Schematischer Vergleich der Struktur des humanen ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Es werden die einzelnen strukturellen Domänen sowie der Prozentsatz der übereinstimmenden Aminosäuren bei beiden Östrogenrezeptoren gezeigt. Die horizontalen Linien zeigen die unterschiedlichen Funktionseinheiten an (aus Peng & Jordan S.190).



Während ER $\alpha$  als klassischer Östrogenrezeptor für typische Funktionen wie Proliferationsvermittlung verantwortlich ist (Doisneau-Sixou et al. 2003; Peng & Jordan 2008, S.189), wird ER $\beta$  in einigen Aspekten als Gegenspieler gesehen und als Tumorsuppressor mit anti-proliferativen Eigenschaften diskutiert (Lazennec et al. 2001; Bardin et al. 2004; Cheng et al. 2004; Treeck et al. 2007; Hodges-Gallagher et al. 2008; Speirs & Shaaban 2009, S.19), wobei die klinische Bedeutung der einzelnen Isoformen noch abschließend geklärt werden muss. Diese ER $\beta$ -Isoformen (ER $\beta$ 1-5), die sich durch eine jeweils spezifische Sequenz in Exon 8 unterscheiden, üben teilweise abweichende Funktionen aus. Während ER $\beta$ 1 sowohl in der Lage ist, den Liganden Östradiol zu binden und über EREs die Transkription responsiver Gene zu steigern, fehlen diese Eigenschaften bei ER $\beta$ 2. Seine Funktion besteht in der Modulation der Wirkung anderer ERs durch Heterodimerisation. ER $\beta$ 1 scheint antiproliferative Eigenschaften auszuüben und auch ER $\beta$ 2 hemmt die DNA-Bindung der Rezeptorkomplexe. Bei ER $\beta$ 3 wiederum handelt es sich offenbar um eine Isoform, die vor Allem im Hoden exprimiert wird. ER $\beta$ 4 und 5 hingegen binden den Liganden Östradiol nicht, üben jedoch eine starke östrogen-unabhängige Wirkung auf die Transkription aus und hemmen ebenfalls über die Bildung von Heterodimeren die Aktivität von ER $\alpha$  (Speirs & Shaaban 2009, S.19f.).

### **1.2.3. Einfluss von Östrogenen auf die zelluläre Proliferation**

Mittels der verschiedenen beschriebenen Signaltransduktionsmechanismen und Rezeptortypen sind Östrogene in der Lage, die Zellen sowohl in Richtung Proliferation als auch in einen differenzierten Zustand zu lenken (Borellini & Oka 1989). Eine proliferative Antwort wird dabei in hormonsensiblen Geweben beispielsweise durch Beeinflussung von Zellzyklusgenen erreicht (Kashima et al. 2009). So konnte gezeigt werden, dass Östradiol über eine generelle Hochregulierung proliferationsfördernder Faktoren das Zellwachstum beeinflusst. Darunter fallen sowohl antiapoptotische Gene und verschiedene Wachstumsfaktoren als auch Gene, die für ein Durchlaufen des Zellzyklus erforderlich sind. Hierbei ist der Ansatzpunkt der Östrogenwirkung vor Allem in der G1-Phase zu sehen (Prall et al. 2001, Doisneau-Sixou et al. 2003). Als wichtiges Beispiel für östrogen-regulierte Zellzyklusregulatoren sind hier *Cyclin D1* (Sabbah et al.1999, Cicatiello et al. 2004, Waladali et al. 2008), *Cyclin A* (Doisneau-Sixou et al. 2003, Vendrell et al. 2004) und E (Kashima et al. 2009), sowie *Cell Division Cycles CDC2* und *20* zu nennen (Frasor et al. 2003). Auch Protoonkogene wie *MYC (c-myc)*, *JUN (c-jun)* und *FOS (c-fos)* sind seit Langem als wichtige Zielgene der zellulären Östrogenwirkung bekannt (van der Burg et al. 1989, Szijan et al. 1992, Doisneau-Sixou et al. 2003, Vendrell et al. 2004). *Cyclin D1* und *MYC* stellen hierbei als Kettenglieder zweier Hauptsignalwege besonders wichtige Stellglieder in der Regulierung östrogen-vermittelter Proliferation dar. Beide führen zur Aktivierung von Cyclin E-CDK2 und

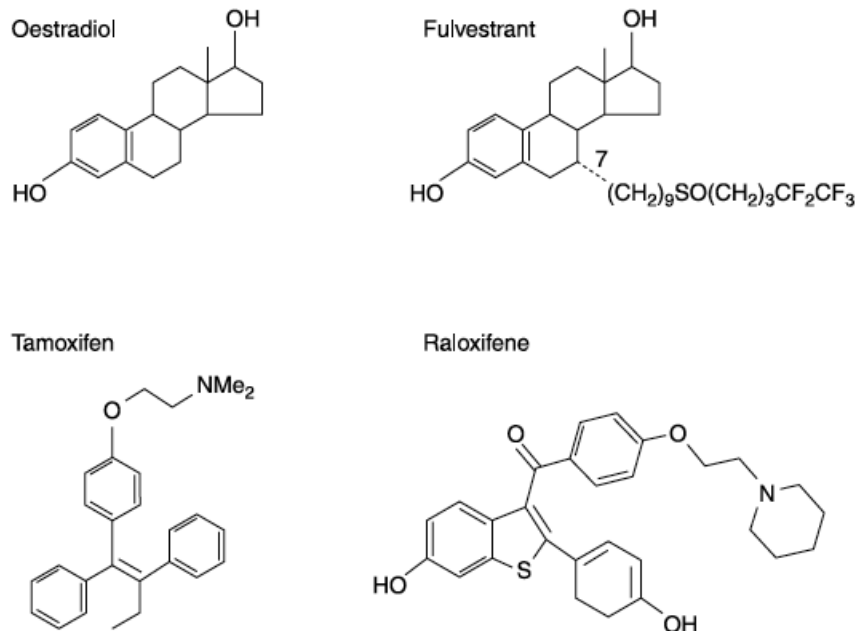
zur Bildung hochmolekularer Cyclin E-CDK2-Komplexe. Die resultierende Phosphorylierung von RB und die Freigabe des Transkriptionsfaktors E2F leitet schließlich als Endstrecke beider Pathways die DNA-Synthese und die Zellzyklusprogression von G1 zu S ein (Doisneau-Sixou *et al.* 2003). Andererseits spielt bei der proliferationsfördernden Wirkung der Östrogene auch die Suppression transkriptionshemmender Faktoren sowie antiproliferativer und proapoptotischer Gene eine essentielle Rolle (Frasor *et al.* 2003). Beispielsweise wird so die Expression von *Cyclin G2* gehemmt, das während der Apoptose hochreguliert wird und Zellzyklusarrest auslöst. Weiterhin wird die Neusynthese und Funktion des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF1* gehemmt (Prall *et al.* 2001), und auch proapoptotische Gene wie *Caspase 9* sind betroffen (Frasor *et al.* 2003).

Eine Vielzahl anderer Gene wird ebenfalls durch Östrogene reguliert, darunter auch wichtige Rezeptoren. So wird der Progesteronrezeptor durch Östrogen hochreguliert (Katzenellenbogen *et al.* 1987), das Protoonkogen *HER2/neu* dagegen supprimiert (Read *et al.* 1990, De Bortoli *et al.* 1992, Russel & Hung 1992). Die proliferationsfördernde Wirkung von Östrogen ist zudem ein wichtiger Faktor, der die Tumorentstehung und das Wachstum von hormonabhängigen Malignomen wie Mamma- oder Endometriumkarzinom fördert und auch zur Entstehung von Ovarialtumoren beitragen soll, was durch epidemiologische Studien bestätigt wird (Pike *et al.* 1993; Cunat *et al.* 2004; Jonat *et al.* 2007, S.240; Bansal *et al.* 2009).

#### **1.2.4. Tumorthherapie mit Östrogenantagonisten**

Die herausragende Rolle von Östrogenen bei der Entstehung und Stimulation gynäkologischer Malignome macht man sich seit einiger Zeit gezielt in der Tumorthherapie und hier vor Allem in der Brustkrebstherapie zunutze. Die Entwicklung des Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM) Tamoxifen kann hierbei als Meilenstein in der Entwicklung einer gezielten Hormontherapie des Mammakarzinoms gesehen werden (Clemons *et al.* 2002). Diese Substanz, ein nichtsteroidales Triphenylderivat (Howell 2006) wird als Östrogenantagonist in der endokrinen Therapie von ER- und PR-positivem Brustkrebs eingesetzt (Clemons *et al.* 2002, Howell 2006). Sie reduziert außerdem bei Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Cuzick *et al.* 2003). Doch neben dieser östrogenantagonistischen Wirkung auf das Brustgewebe zeigt Tamoxifen gewebeabhängig auch agonistische Eigenschaften. So konnte nachgewiesen werden, dass die Tamoxifentherapie als unerwünschten Nebeneffekt das Risiko der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms (Assikis & Jordan 1995, Howell 2006) und das Risiko für thromboembolische Ereignisse erhöht (Howell 2006). Tamoxifen, beziehungsweise sein aktiver Metabolit 4-OH-Tamoxifen, wirkt im Brustgewebe als kompetitiver Antagonist des Östrogens am ER. Während die AF-2-Domäne inaktiviert wird, bleibt die AF-1-Domäne dabei

unbeeinflusst. Tamoxifen antagonisiert so einen Teil der durch Östrogen getriggerten Genexpression (Frasor *et al.* 2004) und ist, wie an MCF-7-Zellen gezeigt, in der Lage, Apoptose zu induzieren (Diel *et al.* 1999). Es erhöht jedoch andererseits die ER $\alpha$ -Expression (Wijayaratne *et al.* 1999).



**Abb. 3** Chemische Strukturformeln von Östradiol, ICI 182,780 (Fulvestrant), Tamoxifen und Raloxifen (aus Howell 2006, S.690).

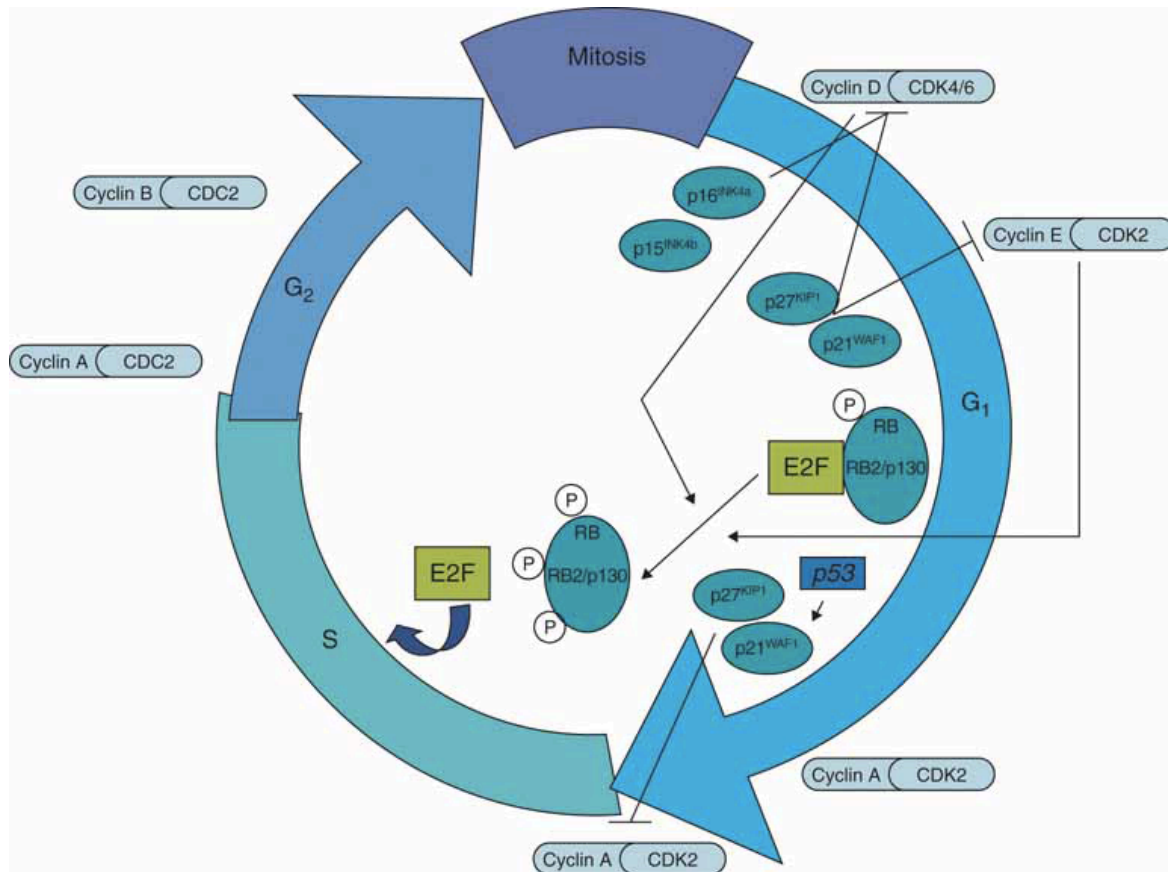
Im Gegensatz dazu konnten bei dem reinen Antiöstrogen ICI 182,780 die agonistischen Nebeneffekte, die 4-OH-Tamoxifen vor Allem auf das Endometrium hat, vermieden werden (Leblanc *et al.* 2007). ICI 182, 780, ein 7 $\alpha$ -alkylsulfinyl-Analogon des 17- $\beta$ -Östradiol (Howell 2006), verhindert am Östrogenrezeptor durch eine Konformationsänderung sowohl die Homodimerisation als auch den energieabhängigen Rezeptortransport zwischen Zytoplasma und Zellkern (Dauvois *et al.* 1993). Weiterhin reduziert die Substanz über eine Beeinflussung des Turnovers und der Halbwertszeit den zellulären ER-Spiegel (Dauvois *et al.* 1992, McClelland *et al.* 1996, Long & Nephew 2006) und hemmt sowohl die AF1- als auch die AF-2 Domäne des Rezeptors (Howell 2006). ICI 182,780 inhibiert so die Expression östrogenabhängiger Gene (Osborne *et al.* 1995, McClelland *et al.* 1996) und antagonisiert somit einen weit größeren Teil der östrogenabhängigen Genexpression als Tamoxifen (Frasor *et al.* 2004). Auch bewirkt es bei MCF-7-Zellen in stärkerem Maße als Tamoxifen die Induktion von Apoptose via Herunterregulation von *BCL-2* (Diel *et al.* 1999).

### 1.3. Zellzykluskontrolle und Rolle in der Tumorentstehung

Östrogene und die entsprechenden Antagonisten nehmen Einfluss auf bedeutende Zellfunktionen, wobei Proliferation und Differenzierung in diesem Kontext zwei wichtige gegensätzliche Entwicklungsmöglichkeiten einer Zelle darstellen. Abhängig von äußeren Bedingungen wie Nährstoffangebot, Zell-Zell-Kontakten und Stimulation durch Wachstumsfaktoren entscheidet sich, ob sie in die teilungsinaktive G0-Phase eintritt, sich endgültig differenziert, oder aber im Zellzyklus fortschreitet und Mitose und Zellteilung durchläuft. Der Zellzyklus, bestehend aus Interphase (G1-, Synthese- und G2-Phase), Mitose und Zytokinese, unterliegt wiederum feinsten Regulationsmechanismen, die eine Steuerung entsprechend der aktuellen Bedürfnisse der Zelle ermöglichen (Krauss 2003, S.429).

Das Durchlaufen der verschiedenen Phasen ist vor Allem abhängig von der Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs), einer Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, die auf die Anwesenheit der für jeden Schritt typischen Cycline angewiesen sind. Durch Bindung dieser Regulatoren bilden die Kinasen aktive heterodimere Komplexe. Die katalytische Aktivität liegt hierbei bei der CDK, während die Cyclinuntereinheit aktivierend wirkt und gleichzeitig die Substratspezifität festlegt (Krauss 2003, S.435; D'Andrilli *et al.* 2007, S.3). Weiterhin wird die Aktivität der CDK-Cyclin-Komplexe beeinflusst von Phosphorylierungen bestimmter Bereiche der CDKs.

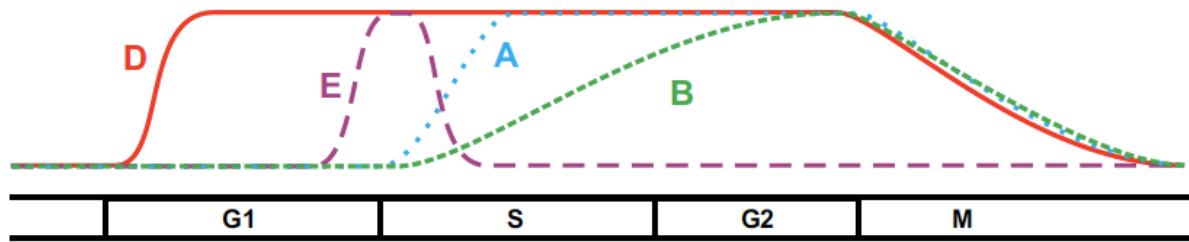
Es sind bisher zwölf verschiedene CDKs bekannt, die jeweils spezifische Cycline binden und individuelle Funktionen ausüben, wobei einige nicht direkt im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus stehen (Malumbres 2008, S.208). Um den Zellzyklus ordnungsgemäß zu durchlaufen, ist eine geregelte Abfolge der Expression der Kinasen CDK4, CDK6, CDK2 und CDK1/CDC2 erforderlich (Krauss 2003, S.435). Dies geht, wie oben erwähnt, einher mit der zyklischen Expression der für jeden Schritt typischen Cycline (Cyclin D, E, A und B), so dass sich jeweils für einen bestimmten Zeitpunkt spezifische CDK-Cyclin-Komplexe in ihrer Steuerungsfunktion ablösen. Diese phosphorylieren wiederum weitere Zielproteine, die für das Voranschreiten des Zellzyklus notwendig sind (D'Andrilli *et al.* 2007, S.4).



**Abb. 4** Schematisches Modell des Zellzyklus bei Säugetieren. Die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins durch die CDKs leitet den Übergang von G<sub>1</sub>- zu S-Phase ein, da hierdurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. Dieser kontrolliert verschiedene Gene, die zur DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Die CKIs p21/WAF1 und p27/KIP1 hemmen die katalytische Aktivität der Cyclin-CDK2-Komplexe und führen so zum Zellzyklusarrest. p16/INK4a hingegen hemmt CDK4/6. Wildtyp p53 aktiviert die Transkription des p21-Gens (Abb. aus und Beschreibung nach d'Andrilli *et al.* 2007, S.4).

Auch die Familie der Cycline umfasst eine Reihe von Mitgliedern, deren Funktionen heterogen und zum Teil noch unvollständig erforscht sind. Sie stimmen jedoch in einer 150-Aminosäuren umfassenden homologen Region (Cyclin-Box) überein. Diese ist für die Bindung der CDK erforderlich (Krauss 2003, S.439). Weiterhin verbindet sie die Eigenschaft, während des Zellzyklus entsprechend des aktuellen Stadiums synthetisiert und später, wenn ihre Funktion nicht mehr benötigt wird, via Ubiquitinierung wieder abgebaut zu werden (Malumbres 2008, S. 210). Ihre Konzentration unterliegt somit zyklischen Schwankungen. Zusätzlich nehmen auch Phosphorylierung und die Verteilung in bestimmten Zellkompartimenten Einfluss auf die Funktion der Cycline. Diese können so den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zugeordnet werden: In der G<sub>1</sub>/S-Phase dominieren D- und E-Cycline, während die M-Phase von der Aktivität der B-Cycline gekennzeichnet ist und

die A-Cycline sowohl für die Synthesephase als auch für G2- und Mitosephase eine wichtige Rolle spielen.



**Abb. 5** Charakteristische Konzentrationsänderungen der Cykline während des Zellzyklus. In der Abbildung dargestellt ist der annähernde Verlauf der Konzentrationsänderungen, sie zeigt nicht die relativen Cyclin-Konzentrationen (aus Krauss 2003, S.440).

Eine weitere Möglichkeit der intrinsischen Zellzykluskontrolle ist durch die Inhibitoren der CDKs gegeben. Sie umfassen zwei Familien, die INK4-Proteine und die CIP/KIP-Proteine. Die Proteine der INK4-Familie (p16 INK4a, p15 INK4b, p18 INK4c und p19 INK4d) hemmen dabei spezifisch CDK4 und CDK6, während die CIP/KIP-Proteine (p21 CIP1/WAF1, p27 KIP1 und p57 KIP2) ein weiteres Spektrum an Kinasen beeinflussen (Krauss 2003, S.445; D'Andrilli et al. 2007, S.4). Der Inhibitor p21/WAF1 beispielsweise hat zunächst einmal die Fähigkeit, Komplexe der CDK2 mit Cyclin A und E zu binden und somit ihre Funktion zu beeinträchtigen. Eine wichtige weitere Eigenschaft dieses Regulators besteht jedoch in der Vermittlung der Wirkung des Tumorsuppressors TP53 in Reaktion auf DNA-Schäden. Zusätzlich kann der Zellzyklus außer durch intrinsische Regulatoren ebenfalls durch extrinsische Signale wie Wachstumsfaktoren kontrolliert werden (Krauss 2003, S.433).

Die Progression der Zelle im Zellzyklus ist somit abhängig von einem fein regulierten, zeitgerechten Zusammenspiel der Cycline und ihrer Kinasen, sowie der Inhibitoren. Bedenkt man die enorme Bedeutung dieser einzelnen Stellglieder für eine geregelte Zellteilung, so ist es leicht vorstellbar, dass Mutationen einzelner Faktoren zur zunehmenden Dysregulation und schließlich zur Entstehung völlig unkontrollierten Wachstums führen können, wie es in einer Krebszelle der Fall ist. Protoonkogene wie Wachstumsfaktorrezeptoren oder Transkriptionsfaktoren können aktiviert und somit zu Onkogenen werden, Tumorsuppressorgene können verloren gehen oder inaktiviert werden. So sind Cycline in Tumorzellen häufig überexprimiert, während die als Tumorsuppressoren bekannten CDK-Inhibitoren oder bestimmte CDK-Substrate in ihrer Funktion gestört sind (d'Andrilli et al. 2007, S.5).

Hierbei betreffen die häufigsten Mutationen Regulatoren der G1-Phase, wie z.B. Cyclin E, Cyclin D1, CDK4 oder die CKIs wie p27/KIP1. Unter den Cyclinen wird eine Aktivierung im Sinne eines Onkogens vor Allem bei den D-Typ-Cyclinen beobachtet, die dann über eine verstärkte Bildung von Cyclin D1-CDK4 oder -CDK6-Komplexen den Zellzyklus antreiben. So wird eine Amplifikation oder Überexpression von Cyclin D1 in einer Vielzahl von Krebsentitäten beschrieben. Darunter fällt auch Brustkrebs, bei dem in 15-20% der Fälle eine Amplifikation, sowie in 50% eine Überexpression vorliegt (D'Andrilli *et al.* 2007, S.6). Weiterhin sind die Signalwege wichtiger Moleküle des Zellzyklus, wie TP53 oder RB, in Tumorzellen häufig gestört. Von besonderer Bedeutung ist hier das Protein p53 – aufgrund seiner vielfältigen regulatorischen Aufgaben auch als „Gatekeeper“ oder „Wächter des Genoms“ (Krauss 2003, S. 487) bezeichnet. Ist *TP53* mutiert, wird der Übergang von G1- zur S-Phase nicht mehr via p21/WAF1 gehemmt. Auch das Einleiten der Apoptose und die Antwort der Zelle auf Stress sind gestört (Krauss 2003, S.487; D'Andrilli *et al.* 2007, S.8). Zudem sind Transkriptionsfaktoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Reparaturenzyme in Krebszellen oft fehlreguliert oder „geschädigt“. Als Beispiel für onkogen mutierte Transkriptionsfaktoren seien hier *JUN*, *FOS* und *MYC* genannt, wobei eine abweichende Aktivierung von *MYC* besonders häufig in Tumorzellen beschrieben wird. Das Protein MYC kontrolliert in seiner physiologischen Funktion wichtige Regulatoren des Zellzyklus, wie Cyclin D1, Cyclin B1, CDK4 oder BRCA1 (Krauss 2003, S.485). Die überschießende Expression dieser Zielgene im Fall einer verstärkten Aktivierung von *MYC* scheint schließlich zur Tumorentstehung zu führen.

#### 1.4. Gynäkologische Tumoren

Bei der Krebsentstehung sind neben Fehlfunktionen der Kontrolle des Zellzyklus vor allem bei Malignomen hormonabhängiger Gewebe wie Mamma, Ovar oder Endometrium auch endokrine Faktoren von Bedeutung. Im physiologischen Zustand werden durch hormonelle Einflüsse so komplexe Vorgänge wie der Menstruationszyklus oder die Brustentwicklung gesteuert und genau abgestimmt. Eine Dysregulation dieser Vorgänge in der Zelle und eine Überstimulation des Zellwachstums jedoch können zur malignen Entartung führen.

Gynäkologische Malignome machen einen bedeutenden Anteil aller Malignome der Frau aus. Das Mammakarzinom stellt sogar die häufigste Tumorerkrankung der Frau sowohl in Deutschland (Inzidenz in West- und Nordeuropa 70-100/100 000 Frauen/Jahr) (Kiechle *et al.* 2004, S.1012; Giersiepen *et al.* 2005) als auch weltweit dar. Die WHO schätzte im Jahr 2000 die Zahl der weltweiten Neuerkrankungen auf über eine Million. Insgesamt verstarben in diesem Jahr 370 000 Frauen an diesem Tumorleiden (Giersiepen *et al.* 2005). Brustkrebs

beim Mann ist sehr selten mit einer Inzidenz von weniger als 1/100 000/Jahr und tritt lediglich bei genetischer Prädisposition wie *BRCA 2* Mutation häufiger auf (Kiechle *et al.* 2004, S.1012 und 1017). Doch neben dem Mammakarzinom sind auch das Endometrium- oder Korpuskarzinom an vierter Stelle (jährliche Inzidenz 27/100 000 Frauen, Daten von 2002) und das Ovarialkarzinom an fünfter Stelle (jährliche Inzidenz 23,5/100 000 Frauen, Daten von 2002) von großer klinischer Bedeutung (Jahn *et al.* 2007).

Brustkrebs als häufigste Krebserkrankung der Frau steht auch bei der Krebsmortalität mit 18% an erster Stelle, wenngleich die Brustkrebsmortalität in fast allen Altersgruppen zwischen 1990 und 2000 zurückgegangen ist. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, nimmt altersabhängig zu, wobei ein besonders steiler Anstieg zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr zu verzeichnen ist. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas mehr als 60 Jahren (Giersiepen *et al.* 2005). Malignome der Brust haben im Vergleich mit solchen anderer Organe eine relativ günstige Prognose. Die Mortalität ist in den letzten Jahren weiterhin zurückgegangen, was einerseits durch verbesserte Früherkennung mittels Mammographie, andererseits aber auch durch verbesserte adjuvante Therapieoptionen bedingt sein mag (Kiechle *et al.* 2004, S.1012). Risikofaktoren lassen sich nach Kiechle *et al.* einteilen in „determinierende Risikofaktoren“ und „allgemeine Risikofaktoren“ (Kiechle *et al.* 2004, S.1012). Unter den „determinierenden“ Faktoren verstehen die Autoren hierbei eine genetische Prädisposition, die bei 5% der Patientinnen gegeben ist, wobei am häufigsten Mutationen in den Genen *BRCA1* und 2 vertreten sind, sowie Strahlenexposition und Hormonsubstitution. Unter „allgemeinen“ Risikofaktoren subsumieren sich fettreiche Nahrung und Adipositas aber auch Alkohol- und Zigarettenkonsum. Andererseits spielen auch der hormonelle Einfluss von Östrogen und Progesteron sowie reproduktive Faktoren eine wesentliche Rolle. So begünstigen eine frühe Menarche und späte Menopause die Entstehung von Brustkrebs, auch Nulliparität oder späte Erstparität stellen einen Risikofaktor dar (Kiechle *et al.* 2004, S.1012; Jonat *et al.* 2007, S.267f.). Histologisch wird beim Mammakarzinom das häufigere duktale Karzinom mit verschiedenen Unterformen sowie das lobuläre Mammakarzinom unterschieden (Kiechle *et al.* 2004, S.1021; Jonat *et al.* 2007, S.268).

Beim Mammakarzinom sind neben den oben genannten äußeren Einflüssen auch typische Veränderungen und Fehlregulationen von Genen bekannt, die die Krebsentstehung begünstigen. Dabei lassen sich somatische Mutationen und Keimbahnmutationen unterscheiden (Kiechle *et al.* 2004, S.1013). Im Fall des Mammakarzinoms wurden einerseits somatische chromosomale Veränderungen wie Trisomien der Chromosomen 7 und 18, Monosomien oder unbalancierte Translokationen festgestellt (Hiddemann *et al.* 2004, S.1013). Andererseits konnten durch neuere Methoden wie die vergleichende genomische



Hybridisierung (CGH: Comparative Genomic Hybridisation) und Loss-of-Heterozygosity-Analysen definierte Genorte eingegrenzt werden, die in diesen Tumoren amplifiziert sind. Darunter fallen auch bekannte Onkogene wie *HER2/neu* (*erbb2*), *MYC* und *Cyclin D1*. *HER2/neu* und *Cyclin D1* sind hierbei mit einer geringeren Lebenserwartung und *MYC* mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Kiechle *et al.* 2004, S.1014). Weiterhin spielen Amplifikationen des Gens des Epidermal-Growth-Factor-Receptor (*EGFR* oder *erbb1*) sowie Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie *TP53* und dem Retinoblastomgen *RB* eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs (Kiechle *et al.* 2004, S.1015). Unter den Keimbahnmutationen sind vor Allem die als Tumorsuppressoren fungierenden Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2* von Bedeutung. Trotzdem stellt diese Auswahl an Genen nur einen Bruchteil der möglicherweise relevanten Veränderungen dar, da viele Kandidatengene noch nicht hinreichend erforscht sind beziehungsweise Mutationen noch nicht identifiziert wurden. Es besteht jedoch die Hoffnung mittels neuer Technologien wie Micro-Arrays durch die Erstellung von Expressionsprofilen verschiedene Untergruppen von Tumoren charakterisieren zu können und so auch Rückschlüsse auf Prognose und Therapieansprechen zu ermöglichen (Kiechle *et al.* 2004, S.1015).

Das Mammakarzinom ist somit von großer klinischer Relevanz und stellt folglich auch in der gynäkologischen Forschung einen wichtigen Schwerpunkt dar. Daneben hat jedoch auch das Endometriumkarzinom einen wichtigen Stellenwert. Trotz der hohen Inzidenz als fünfthäufigstes Malignom der Frau (Kaufmann & Gätje 2004, S.1074) ist - bedingt durch die relativ günstige Prognose - auch hier die Mortalität vergleichsweise niedrig (ca. 3,5/100 000 Frauen/Jahr). Zudem sind Inzidenz- und Mortalitätsraten seit 1980 leicht rückläufig (Jahn *et al.* 2007). Das Korpuskarzinom ist mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 68 Jahren eine Krankheit des höheren Lebensalters (Jonat *et al.* 2007, S.240). Das Erkrankungsrisiko nimmt auch hier mit dem Alter zu. Faktoren, die zur Entstehung eines Endometriumkarzinoms beitragen, sind vor Allem hormoneller Natur: Im Wesentlichen spielen ein erhöhter Östrogeneinfluss beziehungsweise ein Ungleichgewicht zwischen Östrogen- und Progesteroneinfluss (ebda.) eine Rolle. Dies spiegelt sich darin wider, dass eine frühe Menarche, späte Menopause, Kinderlosigkeit und Adipositas, sowie eine postmenopausale reine Östrogentherapie das Erkrankungsrisiko erhöhen (Jahn *et al.* 2007, Fader *et al.* 2009). Histologische Vorstufe des Endometriumkarzinoms ist die adenomatöse Hyperplasie mit Atypien, die durch eine östrogenbedingte Überstimulation ohne kompensatorische Gestagenwirkung entsteht. Beim Endometriumkarzinom werden zwei Gruppen unterschieden: Einerseits das mit ca. 75 bis 80% der Fälle dominierende endometroide Adenokarzinom (Typ I), das hormonabhängig und in der Regel gut differenziert (G1) ist, und andererseits das entdifferenzierte (G3) muzinöse, klarzellige oder serös-papilläre Karzinom (Typ II), das östrogenunabhängig und Progesteronrezeptor-negativ

ist, sowie häufig Mutationen des *TP53*-Gens aufweist und insgesamt eine schlechtere Prognose aufweist (Ellenson 2007; Jonat *et al.* 2007, S.241; Doll *et al.* 2008; Bansal *et al.* 2009). Beim vorherrschenden Typ I, dem endometroiden Adenokarzinom, ist der Tumorsuppressor *PTEN* das am häufigsten mutierte Gen (Ellenson 2007, Doll *et al.* 2008, Bansal *et al.* 2009). Der Verlust dieses Gens stellt vermutlich einen frühen Schritt der Karzinogenese dar und führt zu abnormem Zellwachstum sowie verringerter Apoptose (Bansal *et al.* 2009, Ellenson 2007). Weitere genetische Veränderungen sind Mikrosatelliteninstabilität sowie Mutationen von *KRAS* und *β-Catenin (CTNNB1)* (Ellenson 2007, Doll *et al.* 2008, Bansal *et al.* 2009). In schlecht differenzierten Typ II-Karzinomen hingegen bilden völlig andere genomische Abberationen die Grundlage für die Tumorentstehung: Hier ist eine Mutation des Tumorsuppressors *TP53* am häufigsten zu finden (Ellenson 2007, Doll *et al.* 2008). Außerdem sind diese Karzinome oft durch die Inaktivierung des den Zellzyklus regulierenden Faktors *p16* sowie eine gesteigerte Expression und Genamplifikation des Onkogens *HER2/neu* gekennzeichnet (Doll *et al.* 2008, Bansal *et al.* 2009). Hereditäre Formen des Endometriumkarzinoms im Rahmen des Lynch-Syndroms hingegen sind primär durch Mutationen in Mismatchreparaturgenen bedingt (Nieminen *et al.* 2009).

Im Gegensatz zu eben genanntem Mamma- oder Endometriumkarzinom ist die Prognose beim Ovarialkarzinom, das ca. 4% aller Neoplasien der Frau ausmacht und somit an vierter Stelle nach dem Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinom steht (Kaufmann & Gätje 2004, S. 1074; Huober *et al.* 2004, S.1058), nach wie vor relativ schlecht. Die Mortalitätsrate beträgt mit ca. 8,9/100 000 Einwohnerinnen in etwa das Doppelte der Rate anderer gynäkologischer Malignome, sie hat jedoch ebenfalls in den letzten Jahren abgenommen (Jahn *et al.* 2007). Eine Ursache dieser verhältnismäßig schlechten prognostischen Perspektive ist sicherlich darin zu sehen, dass Frühsymptome sowie effektive Früherkennungsmaßnahmen fehlen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt wie beim Endometriumkarzinom bei 68 Jahren (ebda.). Ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Malignoms des Ovars ist die Anzahl an stattgefundenen Ovulationen. Dementsprechend negative Faktoren sind eine frühe Menarche und späte Menopause sowie Kinderlosigkeit und fehlende Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva in der Anamnese (Huober *et al.* 2004, S.1058; Jahn *et al.* 2007). Eine Erklärung für diesen negativen Einfluss der Ovulationen wird darin gesehen, dass das Oberflächenepithel des Ovars, von dem das Ovarialkarzinom ausgeht, bei den wiederkehrenden Reparaturprozessen in Folge des Eisprungs stark zur Proliferation angeregt wird (Jonat *et al.* 2007, S.250). Aber auch eine genetische Prädisposition ist in 5% der Fälle als Risikofaktor relevant, wobei wie beim Mammakarzinom vor Allem Mutationen der Gene *BRCA-1* und *-2*, die für Reparaturenzyme codieren, verantwortlich sind. Außerdem wird eine Assoziation mit anderen Malignomen beobachtet (Huober *et al.* 2004, S.1058;

Jonat *et al.* 2007, S.250). Histopathologisch wird mit dem Begriff Ovarialkarzinom das epitheliale, vom Keimepithel ausgehende Ovarialkarzinom beschrieben (Jonat *et al.* 2007, S.250). Es existieren jedoch noch eine Vielzahl weiterer bösartiger Neubildungen des Ovars (Huober *et al.* 2004, S.1059; Jonat *et al.* 2007, 251f.). Nach WHO-Richtlinien werden epitheliale Ovarialkarzinome histologisch in weitere Subtypen unterteilt. Hierbei werden seröse (50% der Fälle), endometroide (25% der Fälle), muzinöse (10% der Fälle), klarzellige Karzinome, Übergangszellkarzinome (transitional cell carcinoma), gemischt epitheliale und undifferenzierte Karzinome unterschieden. Diese histologische Unterteilung ist auch richtungsweisend für die Aggressivität der Tumore und das Ansprechen auf Chemotherapie (Karst & Drapkin 2010, S.3). Angesichts dieser unterschiedlichen Eigenschaften ist es nicht überraschend, zu sehen, dass jedem Tumorsubtyp ein eigenes molekulares Profil und entsprechende typische genetische Veränderungen zugrunde liegen. Bei wenig aggressiven muzinösen, endometroiden und low-grade serösen Karzinomen findet man vor Allem Veränderungen in proliferationsassoziierten Genen wie *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*,  $\beta$ -*Catenin* und *TGF- $\beta$ II* (Karst & Drapkin 2010, S.4) Im Gegensatz dazu werden bei hochmalignen serösen Karzinomen häufig Mutationen des Tumorsuppressors *TP53* beschrieben bzw. im Falle der familiären Ovarialkarzinome Veränderungen von *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1* oder *MSH2* (Huober *et al.* 2004, S. 1059; Karst & Drapkin 2010, S.4).

## 1.5. Krebszelllinien

Um die Pathophysiologie der verschiedenen Malignome besser verstehen zu können, sowie eventuelle Therapieoptionen zu erproben, werden seit Langem entsprechende Zelllinien verwendet. Für diese Studie wurden Krebszelllinien ausgewählt, die die oben beschriebenen Entitäten gynäkologischer Malignome repräsentieren. Es wurden die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B, die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Sie dienen dabei nicht nur als Modelle unterschiedlicher Tumorgewebe sondern auch unterschiedlicher Sensibilität für Östrogene.

Die epitheliale Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 wurde hierbei als östrogenunabhängiges Zellkulturmodell gewählt. Sie verfügt zwar über einen Östrogenrezeptor (Jones *et al.* 1994), jedoch wird dieser im Allgemeinen als trunkiert und nicht funktionsfähig beschrieben (Hua *et al.* 1995, Lau *et al.* 1999). Die Östrogenwirkung am veränderten ER $\alpha$  vermag zwar eine Aktivierung von early-response Genen (*MYC*, *FOS*) auszulösen, hat aber keinen Einfluss auf die Expression des *PGR*-Gens (Hua *et al.* 1995). Als mögliche Ursache für den Funktionsverlust könnte eine 32-bp-Deletion in Exon 1 im Gen des ER $\alpha$  (Lau *et al.* 1999) verantwortlich sein. Der Zelllinie wird eine mangelhafte Sensitivität für Östrogene und

Antiöstrogene wie Tamoxifen (Hua *et al.* 1995) zugeschrieben, jedoch zeigte sich in verschiedenen Studien ein wachstumshemmender Effekt von 4-OH-Tamoxifen (Treeck *et al.* 2006), der wohl wie bei rezeptornegativen Karzinomen (Ferlini *et al.* 1999) unabhängig von einer Expression der Östrogenrezeptoren vermittelt zu sein scheint. Abgesehen von dem fehlenden Ansprechen auf Östrogene sind die Zellen weiterhin gekennzeichnet durch *HER2/neu*-Genamplifikation und Überexpression der *HER2/neu*-mRNA sowie des HER2/neu-Proteins und ein relativ aggressives Wachstum (Jones *et al.* 1994, Hua *et al.* 1995).

HEC-1B, eine Endometriumkarzinomzelllinie, ist in der Literatur als sowohl positiv für ER $\alpha$  als auch für ER $\beta$  beschrieben (Acconcia *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006). Gong *et al.* jedoch charakterisieren HEC-1B nach Rezeptorbindungsanalysen und Untersuchung der mRNA-Level als negativ für Östrogenrezeptoren (Gong *et al.* 1994). Die Zelllinie reagiert auf Östrogen mit einer Steigerung der Proliferation und auch der SERM Tamoxifen hat hier - wie für das Endometriumkarzinom in Allgemeinen ebenfalls der Fall (Assikis & Jordan 1995; Zhang *et al.* 2006) - einen östrogen-agonistischen Einfluss (Zhang *et al.* 2006).

Die gut charakterisierte Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ist Östrogen-sensibel und exprimiert sowohl ER $\alpha$  (Brooks *et al.* 1973, Dickson *et al.* 1986, Villalobos *et al.* 1995) als auch ER $\beta$  (Macaluso *et al.* 2006). Tamoxifen und ICI 182,780 wirken an dieser Zelllinie beide als Östrogenantagonisten (Lykessfeldt *et al.* 1994) antiproliferativ und proapoptotisch (Diel *et al.* 1999). Die stabile epitheloide Zelllinie wurde aus dem malignem Pleuraerguss einer Patientin im metastasierten Tumorstadium gewonnen und etabliert (Brooks *et al.* 1973).

## 1.6. Untersuchte Gene

An den entsprechenden Zelllinien sollten molekulare Veränderungen, die in Zusammenhang mit dem Knockdown von *icb-1* stehen, untersucht werden. Für eine Reihe von Genen ist eine Funktion bei Prozessen wie Differenzierung und Proliferation sowie der Östrogenantwort bereits beschrieben worden. Diese können so als Indikatoren für die Entwicklung der Zelle in die eine oder andere Richtung herangezogen werden. Da *icb-1* sowohl bei Differenzierungsprozessen als auch in der Reaktion auf Östrogene eine Rolle zu spielen scheint, wurde für diese Studie eine begrenzte Auswahl an Genen gewählt, die einen Einblick in diese Bereiche der zellulären Funktion ermöglichen sollen.

Zur Untersuchung des Einflusses von *icb-1* auf das zelluläre Östrogensystem sind somit sowohl die schon genauer behandelten Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und die verschiedenen

ER $\beta$ -Varianten (*ER $\beta$ 1*, *ER $\beta$ 2* und *ER $\beta$ 5*) als auch östrogenresponsive Gene wie *PGR* von Bedeutung.

Für die Erfassung der zellulären Proliferation, die einen dem differenzierten Zustand entgegengesetzten Prozess darstellt und deutlich von Steroidhormonen beeinflusst wird, sind verschiedene Zellzyklusregulatoren von Bedeutung. Hierunter fallen die oben beschriebenen Cycline [*Cyclin A2* (Hall *et al.* 2003; Vendrell *et al.* 2004), *Cyclin D1* (Bates & Peters 1995; Hodges *et al.* 2003)], *CDK2* (Krauss 2003, S.436 und 442f.; D'Andrilli *et al.* 2007), der antiproliferative Regulator *p21/WAF1* (Arooz *et al.* 2000) oder das Onkogen *FOS* (Krauss 2003, S.485).

Schließlich wurden einige Gene verwendet, die als teilweise gewebespezifische Marker für Differenzierungsprozesse der verwendeten Zelllinien dienen können. Hierunter fallen sowohl der Epithelzellmarker *Zytokeratin 8 (KRT8)* (Fuchs *et al.* 2002), der im Oberflächenepithel des Ovars stark exprimiert (Gava *et al.* 2008) und durch Östrogen hochreguliert wird (Wang *et al.* 2004), als auch *Fibulin 1c (FIB1/FBLN1)* (Clinton *et al.* 1996; Moll *et al.* 2002). Dies ist ein Gen, das für ein Extrazelluläres Matrixprotein kodiert, welches von Ovarialkrebszellen sezerniert wird (Clinton *et al.* 1996). Die Expression von *Fibulin 1c* wird zudem ER $\alpha$ -abhängig durch Östrogeneinfluss gesteigert (Moll *et al.* 2002). Bei Mammakarzinomzellen hingegen soll es die Zellmotilität hemmen (Hayashido *et al.* 1998). Im Endometrium wird die Expression des *Fibulin 1*-Gens in den Phasen des Menstruationszyklus spezifisch reguliert und kann durch Progesteron induziert werden (Nakamoto *et al.* 2005, Allan *et al.* 2003). Als weiteres wichtiges Gen ist der in einer Vielzahl an Geweben exprimierte Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *Growth-Factor-Independence-1/ growth factor independent 1 transcription repressor (GFI1)* zu nennen. Dieser steht in Zusammenhang mit Granulozyten- und T-Zell-Differenzierung und die Entwicklung der inneren Haarzellen des Innenohrs (Möröy *et al.* 2004). *GFI1* wird jedoch außerdem als Proto-Onkogen (Grimes *et al.* 1996a und b, Kazanijan *et al.* 2004) beschrieben, das als Transkriptionsrepressor den G1- Arrest zu hemmen vermag (Grimes *et al.* 1996a, Zweidler McKay *et al.* 1996).

Im Gegensatz dazu ist *KAL-1*, ein Gen, das bei der X-chromosomal vererbten Variante des Kallmann Syndroms mutiert ist, vor Allem an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen sowie an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Rugarli *et al.* 1999, Hu *et al.* 2003). Das von *KAL-1* kodierte Extrazelluläre-Matrix-Protein Anosmin 1 spielt eine wichtige Rolle beim zielgerichteten axonalen Wachstum und Branching (MacColl *et al.* 2002, Hu *et al.* 2003). Zudem scheint es für seine Funktion auf die Interaktion mit Matrixbestandteilen angewiesen zu sein (Hardelin *et al.* 2001, MacColl *et al.* 2002). Eine weitere Studie mit SCC-Ösophaguskarzinomzelllinien zeigte, dass *KAL-1* bei der metastasierenden Zelllinie

herunterreguliert war, was auf eine Rolle bei der Verhinderung der Migration von Krebszellen hindeutet (Kawamata *et al.* 2003).

Ein weiteres Gen, das in Zusammenhang mit Differenzierung und Apoptose interessant ist, ist *LALBA*, das für das in humaner Muttermilch sezernierte Protein  $\alpha$ -Lactalbumin codiert. Dieses kann in zwei „Faltvarianten“ vorliegen, wobei die eine Form (HAMLET) eine Apoptose induzierende Wirkung besitzt und eine breite zytotoxische Aktivität ausübt. Diese scheint jedoch nur transformierte, embryonale und bestimmte lymphoide Zellen zu betreffen, während mature Epithelzellen von der Wirkung unberührt bleiben (Hakansson *et al.* 1995, Svensson *et al.* 2000).

## 1.7. Zielsetzung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, welche Rolle das östrogenresponsive, differenzierungsassoziierte Gen *icb-1* in der östrogenabhängigen Proliferationskontrolle verschiedener gynäkologischer Krebszelllinien spielt. Da *icb-1* selbst in Abhängigkeit von ER $\alpha$  induziert wird, ist eine eventuelle Funktion dieses Gens bei der zellulären Wirkung des Steroidhormons durchaus vorstellbar. Östradiol beeinflusst bekanntlich in hormonsensiblen Geweben neben Vorgängen wie Differenzierung oder Apoptose vor Allem auch das Zellwachstum. Deshalb wird in dieser Arbeit insbesondere der Einfluss von *icb-1* auf die Proliferation und die damit verbundenen Genexpressionsänderungen analysiert. Als Grundlage für eine gezielte Untersuchung der Funktion des Gens *icb-1* in diesem Kontext wurde diesen Experimenten vorausgehend mittels Transfektion eines shRNA-Plasmids die Expression von *icb-1* in den entsprechenden Zelllinien weitgehend ausgeschaltet. Gleichzeitig wurden mittels unspezifischer shRNA entsprechende Kontrollklone geschaffen. So standen stabile Zellkulturmodelle zur Verfügung, die sich nur in der Expression von *icb-1* unterschieden. Hierdurch konnten spezifisch durch die Funktion des Gens bedingte Effekte bei Proliferations- und Expressionsverhalten detektiert werden. Als wichtige Vertreter hormonsensitiver Gewebe und entsprechender gynäkologischer Malignome fiel die Wahl bei den Versuchszelllinien auf die östrogensensible Zelllinie MCF-7 (Mammakarzinom), sowie die östrogenunabhängigen Zelllinien SK-OV-3 (Ovarialkarzinom) und HEC-1B (Endometriumkarzinom). Mit diesen Zelllinien standen somit nicht nur Repräsentanten unterschiedlicher Gewebstypen, sondern auch Modelle verschieden ausgeprägter Östrogensensitivität zur Verfügung. Neben den vorgesehenen Untersuchungen zur unstimulierten bzw. durch 17- $\beta$ -Östradiol stimulierten Proliferation und Genexpressionsänderung sollten entsprechende Effekte durch zusätzliche Behandlung mit Antiöstrogenen bestätigt werden. Deren Wirkung wurde durch Analysen der Apoptose

ergänzend untersucht. Um eine möglicherweise abweichende Funktion des Gens *icb-1* in Abhängigkeit der beiden Rezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  identifizieren zu können, war zudem der Einsatz spezifischer ER-Agonisten vorgesehen. Diese Untersuchungen im Rahmen meiner Dissertation sollten eine erste, grundlegende Charakterisierung der Rolle von *icb-1* im Kontext der östradiol-vermittelten Genexpression und Proliferation ermöglichen und so einen weiteren Baustein im Verständnis der Funktion dieses noch wenig erforschten Gens beitragen.

## 2.Material und Methoden

### 2.1.Material

#### 2.1.1. Chemische Komponenten

##### 2.1.1.1. Zellkultur

DMEM/F12	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (ohne Phenolrot und Natriumbicarbonat) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Mycoplex™ FBS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum) PAA (Pasching, Österreich)
Serum Replacement 2 (SR2)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
17-β-Östradiol (E2)	Gemisch aus: 17-β-Östradiol jeweils zu gleichen Teilen  in DMEM, Wasser (a) und Ethanol (b):  a) β-Östradiol ≥ 98% in Ethanol: E2758-1G  b) β-Östradiol water soluble  (cyclodextrin – encapsulated 17-β-estradiol): E-4389  Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
4-OH-Tamoxifen	(Z)-4-(1-[4-(Dimethylamino-ethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-butenyl)phenol Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
ICI 182,780	7α,17β-[9[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol Tocris bioscience® (Ellisville, MO, USA)
PPT	4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol Tocris bioscience® (Ellisville, MO, USA)



DPN	2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile Tocris bioscience® (Ellisville, MO, USA)
Staurosporin	(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,13 <i>R</i> )-2,3,10,11,12,13-Hexahydro- 10-methoxy-9-methyl-11-(methylamino)-9,13-epoxy 1 <i>H</i> ,9 <i>H</i> -diindolo[1,2,3- <i>gh</i> :3',2',1'- <i>lm</i> ]pyrrolo[3,4- <i>j</i> ][1,7] benzodiazonin-1-one Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Insulin	Insulin solution from bovine pancreas Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's PBS	PAA (Pasching, Österreich)
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
G-418 Sulphate Solution	PAA (Pasching, Österreich)
Accutase™	PAA (Pasching, Österreich)
Ethanol (100%)	JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
Distilled water,	
DNase/ RNase free (Gibco™)	Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA)
DMSO	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

#### Assays:

Cell Titer Blue™ Cell Viability Assay	Promega® (Madison, WI, USA)
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Promega® (Madison, WI, USA)

### **2.1.1.2. Komponenten für molekulargenetische Untersuchungen**

#### Transfektion:

Transfectin Reagent	BioRad (Hercules, CA, USA)
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA)

#### RNA-Isolation:

SV Total RNA Isolation System	Promega® (Madison, WI, USA)
-------------------------------	-----------------------------

#### cDNA-Synthese:

M-MLV-P Reverse Transcriptase	
RNase H Minus, Point Mutant	Promega® (Madison, WI, USA)
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega® (Madison, WI, USA)
Random Primers	Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA)
10 mM dNTP Mix, PCR Grade	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jeweils 10 mM) Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA)
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen® (Hilden, Deutschland)
LightCycler®FastStart DNA Master	
SYBR Green I	Roche-Diagnostics (Basel, Schweiz)

#### Plasmide:

SureSilencing shRNA plasmid for human icb-1 (C1orf38) gene	SABiosciences™ (Frederick, MD, USA)
---	-------------------------------------

#### Kontrollplasmid:

Silencer™ Negative Control #1 u. #2 siRNA	Ambion® (Austin, TX, USA)
---	---------------------------

#### Primer :

PCR Primer	Metabion® (Planegg-Martinsried, Germany)
------------	--

Primer-Sequenzen (5'→3')

icb-1	TCGAGGGCTCCATCTATGA GAAGTAGCCCTGGAAGTTGG
PR	AACTTGCATGATCTTGTCAAACA CACCATCCCTGCCAATATCT
ER $\alpha$	TGATGAAAGGTGGGATACGA AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
ER $\beta$ 1	GGCATGCGAGTAACAAGGGC GGGAGCCCTCTTTGCTTTT
ER $\beta$ 2	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG TTCTGCCCTCGCATGC
ER $\beta$ 5	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG CGTACCTCGCATGCCTGA
FOS	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG
CycD1	CTGGAGGTCTGCGAGGAA GGGGATGGTCTCCTTCATCT

p21/WAF	GCATGACAGATTTCTACCACTCC AAGATGTAGAGCGGGCCTTT
KRT8	AGGCAGCTATATGAAGAGGAGAT GCAATGATGCTGTCCATGTC
Fibulin1c	CGAGTGCCCTGAGAACTACC GATGTTGGTGGGGAAAGAGA
LALBA	CCT GTG ACA AGT TCC TGG AT CTC ACA AAG CCA CTG TTC CA
GFI-1	TCG CAG GAA CGG AGC TTT CTT CTG GTG GAA CCT CTT GC
KAL-1	CAA TGT TCT AAG TGC CTG GAG TCA CAG CTG GTC AAG CAT TC
CycA2	CTGCTGCTATGCTGTTAGCC TGTTGGAGCAGCTAAGTCAAAA
CDK2	TCCTCTTCCCCTCATCAAGA CAGGGA CTCCAAAAGCTCTG
$\beta$ -Actin	CTGTGGCATCCACGAAACTA CGCTCAGGAGGAGCAATG

### 2.1.2. Technische Komponenten und Geräte

Victor3™ Multilabel Counter	Perkin-Elmer® (Waltham, MA, USA)
-----------------------------	----------------------------------

#### Cycler:

LightCycler PCR Device	Roche-Diagnostics (Basel, Schweiz)
------------------------	------------------------------------

Thermocycler T-Gradient 96	Biometra® (Göttingen, Deutschland)
----------------------------	------------------------------------

T1Thermocycler	Biometra® (Göttingen, Deutschland)
----------------	------------------------------------

#### Zellkultur-Brutschrank:

HERACell 150 CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
--	------------------------------

#### Sterilbank:

HERAsafe® Type KS12

Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
---------------------------------------	---

#### Zentrifugen/Mixer:

Thermomixer compact	Eppendorf® (Hamburg, Deutschland)
---------------------	-----------------------------------

MS2Minishaker	IKA® (Staufen, Deutschland)
---------------	-----------------------------

Biofuge® fresco	Heraeus (Hanau, Deutschland)
-----------------	------------------------------

Multifuge® 1 s-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
------------------	------------------------------

#### Photometer:

GeneRay UV-Photometer	Biometra® (Göttingen, Deutschland)
-----------------------	------------------------------------

Präzisionsküvetten Suprasil®	Hellma® (Müllheim, Deutschland)
------------------------------	---------------------------------

#### Reaktionsgefäße:

PP-Schraubverschlussröhrchen	Greiner bio-one International AG (Kremsmünster, Österreich)
------------------------------	--

Nalgene Cryoware™ Cryogenic vials	Nalgene® Labware (Rochester , NY)
-----------------------------------	-----------------------------------

Eppendorf Cups 1,6 ml	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Softstripes 0,2 ml mit Deckel	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Zellkulturflaschen T75 und T150	Armin Baack (Schwerin, Deutschland)
Zellkulturplatten 6-well, 96-well steril	Armin Baack (Schwerin, Deutschland)
Testplatten weiß 96-well	Corning (Corning, NY,USA)
<u>Pipetten:</u>	
5 ml-, 10 ml-, 25 ml-Pipetten	Armin Baack (Schwerin, Deutschland)
Aspirationspipette	Sarstedt® (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettierhilfe : accu-jet® pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Eppendorf® Reference (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf® (Hamburg, Deutschland)
<u>Pipettenspitzen:</u>	
Für automatische Pipetten:	
Combitips® plus (1 und 5 ml)	Eppendorf® (Hamburg, Deutschland)
Für manuelle Pipetten:	
Biosphere® Quality Tips	
Biosphere® Filtertips (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt® (Nümbrecht, Deutschland)

### **2.1.3. Zelllinien**

HEC-1B (Endometrium)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
MCF-7 (Mamma)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
SK-OV-3 (Ovar)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

#### **2.2.1.1. Standardbedingungen**

Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurden in Standardkulturmedium DMEM/F12 kultiviert, das mit 10% FBS sowie 1 mM Natriumpyruvat und 10 ng/ml Insulin ergänzt wurde. Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 wuchs in DMEM/F12 mit 10% FBS. Alle Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C in einem feuchten Milieu im Inkubator kultiviert.

#### **2.2.1.2. Allgemeine Zellkulturmethoden**

##### Mediumwechsel

Dreimal pro Woche wurde das Kulturmedium erneuert, um für die Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Hierzu wurde das „verbrauchte“ Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches, erwärmtes Medium zugegeben.

##### Splitten

Bei Erreichen der Konfluenz oder für die weitere Verwendung in Versuchen, wurden die Zellen mit Hilfe des Enzyms Accutase™ vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Hierzu wurde zunächst das Medium unter der Sterilbank abgesaugt. Um letzte Reste des Kulturmediums zu entfernen, wurden 5 ml PBS (phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung) hinzugegeben, die Flasche leicht geschwenkt und anschließend die Flüssigkeit vorsichtig wieder abgesaugt. Nach dem Hinzugeben der Accutase™ (3 ml), mussten die Zellen für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert werden.

Wenn alle Zellen abgelöst waren, wurde die Reaktion mittels Zugabe von Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon überführt.

Anschließend wurden die korpuskulären Bestandteile für 5 Minuten bei 770 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde abgesaugt während das Pellet nun im entsprechenden für die Versuche benötigten Medium oder im Kulturmedium resuspendiert werden konnte. Für die weitere Kultur wurde nun ein gewisser Anteil der Suspension verworfen und die verbleibenden Zellen mit ausreichend Medium wieder in die Zellkulturflasche überführt.

### Aussaat

Zur Aussaat der Zellen für Versuche wurden die speziell vorbereiteten oder nativen Zellen wie oben beschrieben accutasiert, abzentrifugiert und in einem definierten Volumen resuspendiert. Um für die Experimente vorgegebene Zellzahlen einsetzen zu können wurde eine Stichprobe von 12 µl der gut gemischten Zellsuspension in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Aufgrund der bekannten Zellzahl und Volumina der Suspension und der Zählkammer wurde die Gesamtzellzahl berechnet. Die für die Versuche benötigten Zellzahlen konnten so anschließend aus der Suspension gewonnen werden.

Für die unstimulierten Proliferationsexperimente wurde die benötigte Zellzahl gleich im Endvolumen von 100 µl auf 96-well-plates mit einer automatischen Pipette ausgesät. Im Fall der Stimulationsexperimente hingegen in 70 µl Medium, um die spätere Zugabe der Stimulantien (30 µl) zu ermöglichen. Für Experimente in Medium mit 10% FBS wurden jeweils Sechsfachwerte von 500 bzw. 1000 Zellen/ Well ausgesät, bei Experimenten in serumfreiem Medium wurde die Zellzahl dem Wachstumsverhalten der Zelllinien angepasst und jeweils Dreifachwerte von 1000 Zellen/ Well (SK-OV-3), 2500 Zellen/ Well (MCF-7) oder 3000 Zellen/ Well (HEC-1B) verwendet. Bei den Apoptoseversuchen hingegen wurden für den Caspase-Glo<sup>TM</sup>3/7-Assay jeweils Einfachwerte mit 5000 Zellen/ Well eingesetzt. Nach der Aussaat wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

### Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen einer T-75-Zellkulturflasche musste zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Dann konnten die Zellen durch Inkubation mit Accutase<sup>TM</sup> aus den Zellkulturflaschen gelöst werden. Waren alle Zellen abgelöst, wurde die Reaktion mit ca. 5 ml DMEM/F12+10% FBS gestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon geben und für 5 min bei 770 Umdrehungen/ min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 4 °C kaltem DMEM/F12 + 10% FBS + 5% DMSO-Medium (bzw. in dem für die jeweilige Zelllinie



spezifischen Medium + 5% DMSO) resuspendiert. Dann wurde je 1 ml Zellsuspension in ein 2 ml-Cryoröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Kryoröhrchen auf Eis gestellt und sofort in den -80°C-Schrank gebracht. Nach frühestens 24 Stunden und spätestens 4 Wochen wurden die Zellen dann vom -80°C-Schrank in den Stickstofftank verlegt.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C im Brutschrank angewärmt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit 15 ml Standardkulturmedium pipettiert. Danach musste nach frühestens 6 und spätestens 18 Stunden ein erneuter Mediumwechsel erfolgen, um den verbliebenen Anteil an DMSO zu entfernen.

### **2.2.1.3. Stimulationsexperimente**

Für Stimulationsexperimente mit 17- $\beta$ -Östradiol, 4-OH-Tamoxifen oder ICI 182, 780 wurden die Zellen "heruntergehungert". Das heißt, den Zellen wurde schrittweise der Serumanteil des Mediums entzogen und sie wurden anschließend in serumfreien 1x SR2-Medium ausgesät. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass der Einfluss der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren oder Östrogene bis zu Beginn der Versuche ausreichend reduziert werden konnte. Zunächst wurden die Zellen hierfür morgens entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise gewonnen und auf 6-well-plates in Medium mit 5% Serum-Anteil ausgesät. Nach ausreichender Inkubation und Adhärenz der Zellen wurde das Medium abends gewechselt und durch DMEM/F12 + 1% FBS + 0,5x SR2 (Serum-Replacement-2) ersetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen accutasiert, in 1x SR2 resuspendiert und wie oben beschrieben ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde am nächsten Tag die Stimulation durchgeführt.

Für die Stimulation wurden 17- $\beta$ -Östradiol (0,03 nM bis 30 nM), 4-OH-Tamoxifen (1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M), ICI 182, 780 (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) verwendet, wobei 4-OH-Tamoxifen und ICI 182, 780 entweder allein oder in Kombination mit 3 nM 17- $\beta$ -Östradiol eingesetzt wurden. Bei weiteren Stimulationsversuchen wurden die Zellen mit PPT (0,001  $\mu$ M bis 1  $\mu$ M) und DPN (0,001  $\mu$ M bis 1  $\mu$ M) behandelt.

Die entsprechenden Substanzen wurden in 1x SR2-Medium unter Berücksichtigung des weiteren Verdünnungseffektes durch die Zugabe zum schon in den Wells vorhandenen Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und die Zellen mit 30  $\mu$ l der Lösung stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen in serumfreiem Medium und eine Lösungsmittelkontrolle mit der jeweils höchsten Konzentration des Lösungsmittels (Ethanol oder DMSO). Die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen enthielten die gleiche Konzentration des Lösungsmittels. Unstimulierte Kontrollen wurden mit 1x SR2 behandelt.

### Proliferationsbestimmung mittels Cell Titre Blue Assay

Die ursprüngliche Anzahl stoffwechselaktiver Zellen wurde am Tag der Stimulation mit Hilfe des fluorimetrischen CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) ermittelt, indem die Konversion des Redoxfarbstoffes Reazurin in sein fluoreszierendes Endprodukt Resorufin durch metabolisch aktive Zellen gemessen wurde. Die Messungen wurden entsprechend der Herstellerangaben bei 560Ex/ 590Em nm in einem Victor3™ Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Waltham, MD, USA) durchgeführt. Die relative Anzahl stoffwechselaktiver Zellen nach der Stimulation wurde an Tag 3, 5 und 7 oder im Fall der Experimente mit E2, PPT und DPN nur an Tag 7 gemessen.

Die Proliferation wurde in Prozent der ursprünglichen Zellzahl oder in Prozent der unbehandelten oder Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt.

### Bestimmung der Apoptose mittels Caspase-Glo™3/7 Assay

Für Apoptose-Assays wurden die Zellen nach den vorbereitenden Verfahren und der Aussaat mit 3nM 17- $\beta$ -Östradiol, 4-OH-Tamoxifen (25  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 5  $\mu$ M) in Kombination mit 3 nM 17- $\beta$ -Östradiol oder der Apoptose induzierenden Substanz Staurosporin (1  $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M; 0,01  $\mu$ M) als Positivkontrolle stimuliert. Nach 6 h und 24 h wurde die relative Zellzahl der in Apoptose befindlichen Zellen ermittelt, indem die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen wurde. Hierzu wurde der luminometrische Caspase-Glo™3/7 Assay (Promega) entsprechend des Hersteller-Protokolls eingesetzt und die Proben in einem Victor3 Multilabel Counter (Perkin-Elmer) gemessen.

Um das natürliche Zellwachstum berücksichtigen zu können, wurde die relative Zellzahl der unbehandelten Zellen mittels CTB-Assay ermittelt und die Caspase Werte hiermit normalisiert. Die Daten der Apoptosemessung wurden ausgedrückt in Prozent der unbehandelten Kontrolle, der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle oder in Prozent des Kontroll-Klones.

## **2.2.2. Molekulargenetische Methoden**

### **2.2.2.1. Transfektion**

Für die Transfektion wurden 10<sup>6</sup> Zellen/ Well auf eine 6-Well-Platte in DMEM/F12 mit 10% FBS ausgesät. Am nächsten Tag wurde 1,2 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorbereitet, indem 8  $\mu$ l Transfectin Reagent (BioRad) und 1  $\mu$ g shRNA-Plasmid-Mix (short hairpin RNA/ Hairpin siRNA) oder Kontrollplasmid-DNA in Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Invitrogen) gemischt und die

fertige Lösung anschließend zu den kultivierten Zellen hinzugegeben wurde (vgl. Lee & Sinko 2006).

Die Transfektion mit *icb-1*-shRNA wurde mit einer Mischung aus vier Plasmiden (SureSilencing, SABiosciences, Frederick, USA) durchgeführt, die die *icb-1*-spezifischen shRNA-Insert-Sequenzen 5'-gggagtagctttgtggaaact-3', 5'-cacctgagcttctctatgaat-3', 5'-gtagaccaagcctgatagat-3' und 5'-catggattaatgtgggaactt' enthalten. Diese binden an *icb-1* Exon 6, das in allen Splicevarianten vorhanden ist. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Plasmid mit dem unspezifischen Insert 5'-ggaatctcattcgatgcatac-3' verwendet. Um Klone mit stabiler Expression zu generieren, wurde 48 Stunden nach der Transfektion mit der G 418 Selektion (300 µg/ ml) begonnen. Die Isolation der ersten Klone erfolgte nach frühestens 6 Wochen Selektion.

#### **2.2.2.2. RNA-Isolierung und cDNA Synthese**

Die gesamte RNA wurde mittels SV Total RNA Isolation System (Promega) entsprechend der Herstelleranweisungen isoliert. Anschließend wurde die Reinheit photometrisch bestimmt. Aus 0,3 µg RNA wurde cDNA synthetisiert, wobei 100 U M-MLV-P Reverse Transcriptase (Promega), 2,5 mM dNTP Mischung und 50 pM Random Primer (Invitrogen) verwendet wurden.

#### **2.2.2.3. RT-PCR**

Für die real-time-RT-PCR Detektion von *icb-1*-mRNA oder den Intron-umfassenden Nachweis der Expression von Hormonrezeptoren, Östrogen-Zielgenen und Zellzyklusgenen oder differenzierungsassoziierten Genen wurden 2 µl cDNA mit Hilfe des Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) und des LightCycler PCR Device (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) amplifiziert.

Das PCR Programm war 95 °C für 15 min, gefolgt von 45 PCR Zyklen (95 °C für 10 s, 56 °C für 30 s, 72 °C für 30 s) und eine abschließende Extension für 5 min bei 72 °C sowie eine Standardanalyse der Schmelzkurven. Um die Ergebnisse zu optimieren, wurde für eine weitere Gruppe von Experimenten Light Cycler®FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) verwendet. Hier war das PCR- Programm 95 °C für 15 min (Denaturierung), gefolgt von 37 Cycles (95 °C für 10 s, 60 °C für 1 s, 72 °C für 12 s, inklusive Messung), die durch eine Standardanalyse der Schmelzkurve vervollständigt wurden.

In allen RT-PCR Experimenten wurde ein 190 bp Fragment des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin als Referenzgen amplifiziert, wobei die Intron-umfassenden Primer actin-2573 und actin-2876 eingesetzt wurden.

Nach Verdünnungsexperimenten mit Probe-cDNA, die im Vorfeld der Arbeit bestätigt hatten, dass die Effizienz aller Primer näherungsweise gleich war (Ståhlberg et al. 2003), wurden die Daten mit Hilfe der vergleichenden  $\Delta\Delta C_T$  Methode (Livak & Schmittgen 2001) analysiert. Hierbei wurde die Differenz zwischen dem Schwellenzyklus-Wert (threshold cycle,  $C_T$ -Wert) von Ziel- und Referenzgen der jeweiligen Probe berechnet und anschließend die resultierenden  $\Delta C_T$  Werte der verschiedenen Proben verglichen. In diesen Experimenten wurde mRNA, die nicht zur reversen Transkription genutzt wurde, als Negativkontrolle verwendet, um cDNA und Vektor- oder genomische DNA-Amplifikation unterscheiden zu können.

### **2.2.3.Statistik**

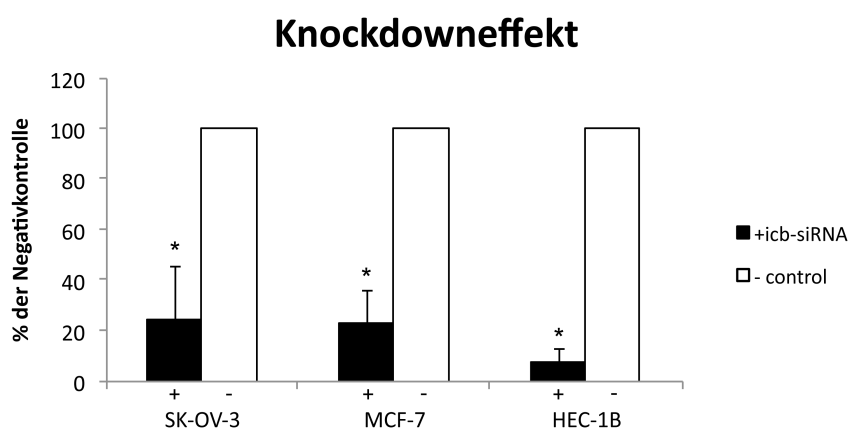
Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft EXCEL 2007 und SPSS 16.0 German mittels des studentischen T-Tests durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei  $p < 0,05$  angenommen wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Stabiler Knockdown von *icb-1* in den Krebszelllinien SK-OV-3, HEC-1B und MCF-7

Um die Funktion von *icb-1* im Zusammenhang mit der Proliferation von Zellen untersuchen zu können, wurde das Gen im Vorfeld der Versuche in einem auf siRNA (small inhibiting RNA / short interfering RNA) basierenden Verfahren down-geknockt. Hierzu wurden die entsprechenden Zelllinien - HEC-1B, MCF-7 und SK-OV-3 - mit einem shRNA-Plasmid (short hairpin RNA) für das humane Gen *icb-1* oder einem für unspezifische shRNA codierendem Plasmid, das als Negativkontrolle diente, transfiziert.

Nach sechs Wochen Selektion mit G 418 wurden drei Klone der jeweiligen Zelllinie ausgewählt und die *icb-1*-mRNA-Level mittels real time RT-PCR-Analyse bestimmt. Die stabile Expression der *icb-1*-shRNA bewirkte eine deutliche Reduktion der *icb-1*-Transkription. Bei HEC-1B betrug die Expression nur noch 7% der Negativkontrolle ( $p < 0,0001$ ), bei MCF-7 23% ( $p < 0,0001$ ) und bei SK-OV-3 34% ( $p < 0,0001$ ) (s. Abb. 6). Die Expression in den einzelnen Knockdownklonen der entsprechenden Zelllinien unterschied sich jedoch nicht voneinander. Die generierten Zelllinien wurden HEC-1B/*icb*KD, MCF-7/*icb*KD und SK-OV-3/*icb*KD genannt. Den Erfolg des *icb-1*-Knockdowns auf Proteinebene zu verifizieren war allerdings nicht möglich, da bisher kein Antikörper für das Icb-1-Protein existiert.



**Abb. 6** Nachweis des Knockdowns von *icb-1* mittels real-time-RT-PCR. Gezeigt werden die *icb-1*-Transkripte von MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Zellen mit stabiler Expression von *icb-1*-shRNA in Relation zu Negativkontrollzellen der entsprechenden Zelllinien mit nicht-spezifischer shRNA-Expression (dargestellt als 100%). \* $P < 0,0001$  versus Kontrolle

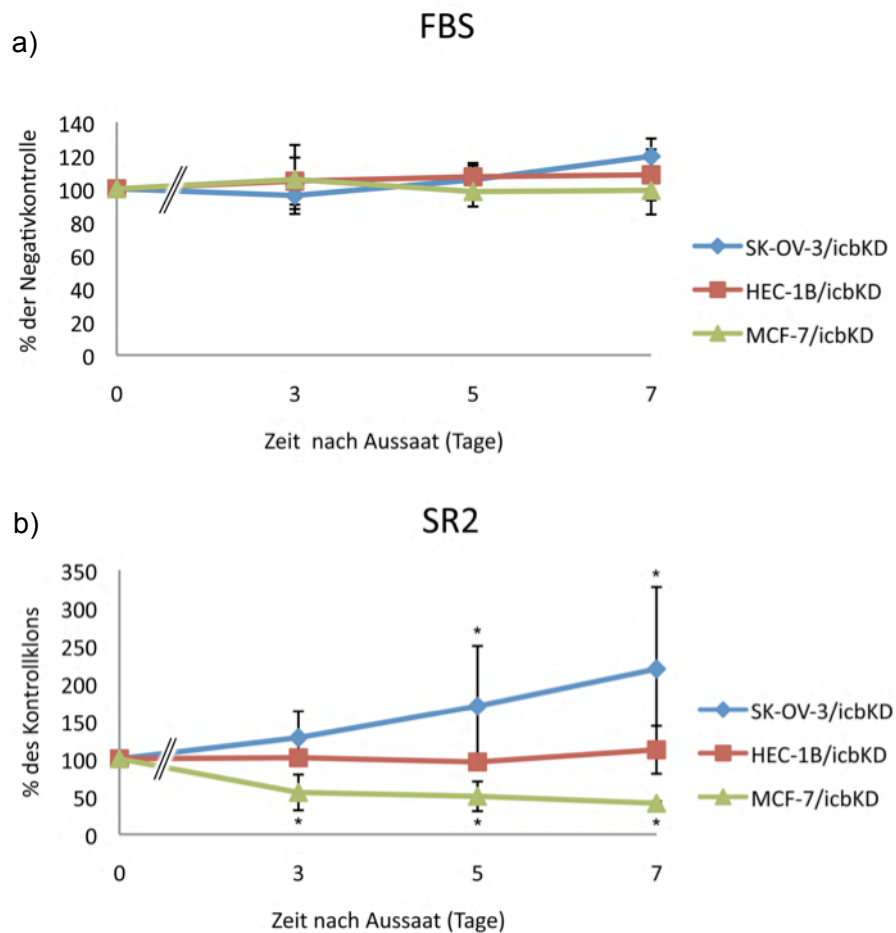
Durch den erfolgreichen Knockdown konnten in den folgenden Versuchen Klone der jeweiligen Zelllinien untersucht und verglichen werden, die sich nur hinsichtlich ihrer

Expression von *icb-1* unterschieden, um so Rückschlüsse auf die Funktion des Genes *icb-1* zu ziehen.

### **3.2. Auswirkungen des Knockdowns von *icb-1* auf die Proliferation**

#### **3.2.1. Proliferation unter Standardbedingungen**

Zunächst wurden die *icb-1*-Knockdown-Klone der jeweiligen Zelllinien (genannt HEC-1B/*icb*KD, MCF-7/*icb*KD, SK-OV-3/*icb*KD) im Hinblick auf ihr Wachstum mit den Negativkontrollen verglichen. Die Proliferation wurde dabei sowohl in Standard-Kulturmedium DMEM/F12 mit 10% FBS als auch in serumfreiem DMEM/F12-Medium mit Serum Replacement 2 (1x SR2) untersucht. In Medium mit 10% FBS unterschieden sich die Knockdownklone und die Negativkontrollen kaum in ihrem Wachstumsverhalten. Während der Knockdown von *icb-1* bei den SK-OV-3/*icb*KD-Ovarialkrebszellen eine leichte, jedoch nicht signifikante Wachstumssteigerung auf ca. 120% der Negativkontrolle an Tag 7 bewirkte, war bei MCF-7/*icb*KD und bei HEC-1B/*icb*KD kein Effekt festzustellen (s. Abb. 7a). In serumfreiem Medium bot sich ein davon abweichendes, zelllinienabhängiges Bild. Zunächst konnte bei SK-OV-3/*icb*KD eine stärkere, signifikante Wachstumssteigerung auf etwa 219% der Negativkontrolle (Tag 7) ( $p=0,011$ ) beobachtet werden. Die HEC-1B/*icb*KD Zellen jedoch zeigten mit 112% der Negativkontrolle an Tag 7 keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zum Wachstum der Negativkontrolle. Das Wachstum des MCF-7/*icb*KD Klons schließlich war sogar auf bis zu 41% der Negativkontrolle (Tag 7) reduziert ( $p=0,0117$ ) (s. Abb. 7b).

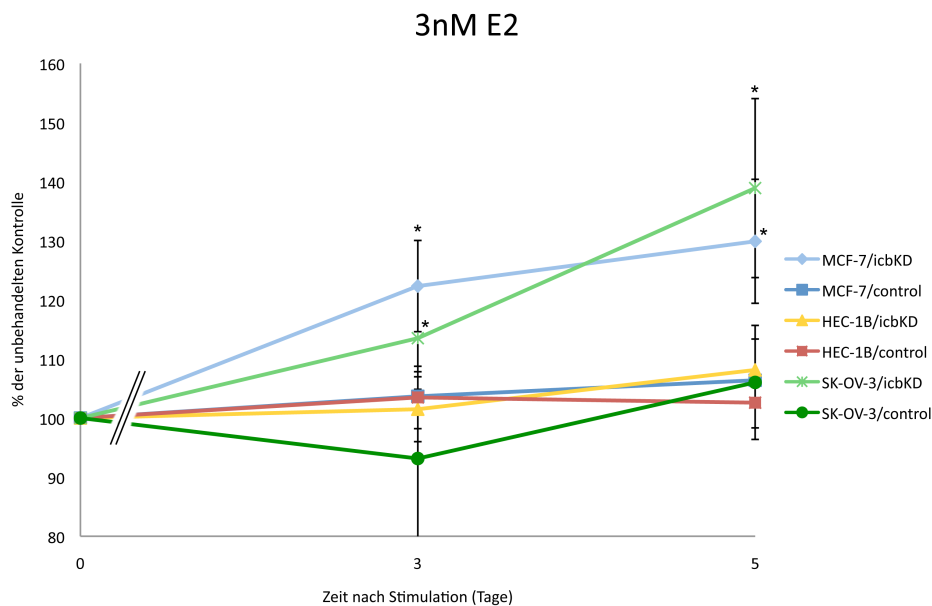


**Abb. 7** Proliferation von HEC-1B-, MCF-7- und SK-OV-3-Zellen mit stabiler Expression von *icb-1*-sh-RNA in serumhaltigem Kulturmedium (a) oder serumfreiem Kulturmedium (b). Die angegebenen Zellen wurden in phenol-rot-freiem DMEM/F12 mit 10% FBS (a) bzw. mit 1x Serum Replacement 2 (SR2) (b) kultiviert. Das Zellwachstum wurde an Tag 0, 3, 5 und 7 mittels eines auf Reazurin basierenden CTB-Assays wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Das Wachstum wird angegeben in Bezug auf die Negativkontrollklone mit nicht-spezifischer shRNA-Expression (definiert als 100%). \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle bzw. 100%

### 3.2.2. Wachstumsverhalten in Reaktion auf 17- $\beta$ -Östradiol sowie PPT und DPN

#### 3.2.2.1. 17- $\beta$ -Östradiol

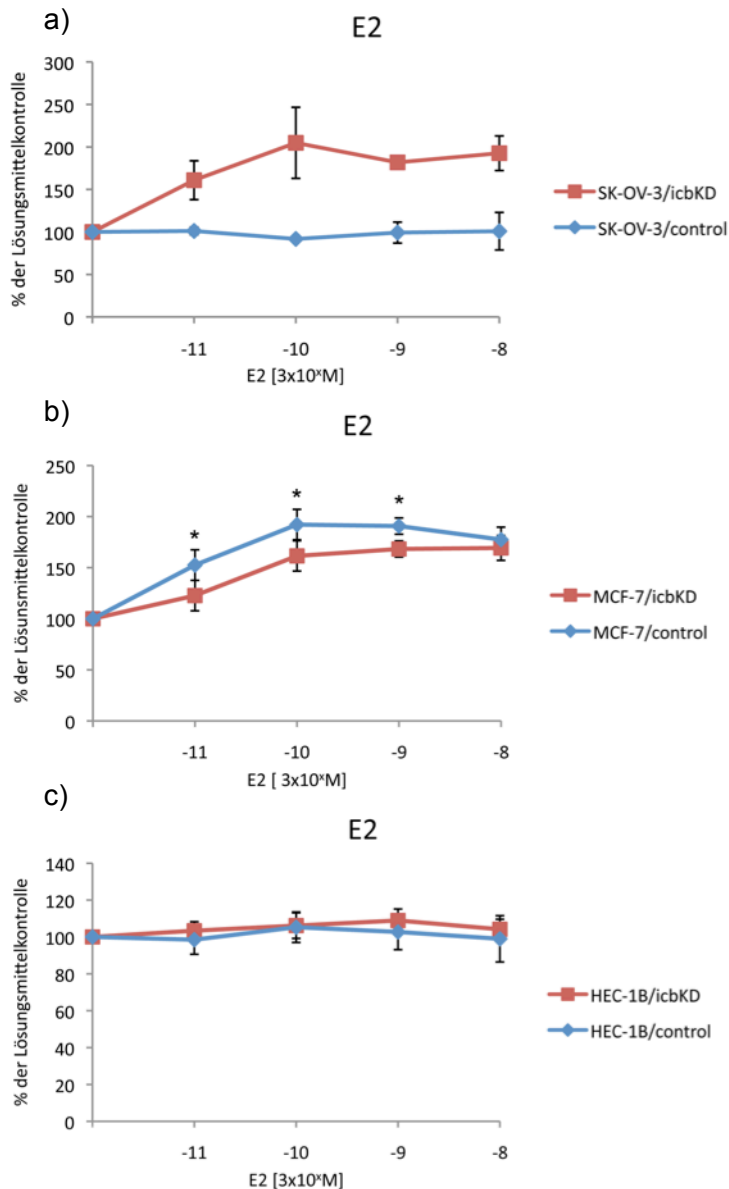
Da Östrogene großen Einfluss auf die Proliferation hormonsensibler Gewebe haben, wurde nun die Rolle von *icb-1* in diesem Kontext in weiteren Proliferationsassays untersucht. Diese wurden in serumfreiem Medium mit dem Steroidhormon 17- $\beta$ -Östradiol (E2) in einer Konzentration von 3 nM durchgeführt. Wiederum wurden Knockdown-Klone und Negativkontrollen verglichen, um den Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die durch E2 ausgelöste Proliferation der Zellen zu ermitteln.



**Abb. 8** Östradiol-getriggerte Proliferation von HEC-1B-, MCF-7- und SK-OV-3-Zellen mit stabiler Expression von *icb-1*-sh-RNA beziehungsweise mit nicht spezifischer shRNA-Expression. Die angegebenen Zellen wurden in phenol-rot-freiem DMEM/F12 mit 1x Serum-Replacement 2 (SR2) kultiviert, mit 3 nM E2 stimuliert und das Zellwachstum an Tag 0, 3, 5 mittels eines auf Reazurin basierenden Assays wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Das Wachstum wird angegeben in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (DMEM/F12 mit 1xSR2). \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

Als wohl bemerkenswertestes Ergebnis dieser Versuchsreihe löste der *icb-1*-Knockdown eine starke proliferative Antwort auf E2 bei der eigentlich östrogenunabhängigen Ovarialkrebszelllinie SK-OV-3 aus. Während der SK-OV-3-Kontrollklon sich in seinem Wachstum nicht von unbehandelten Zellen unterschied und somit keine Reaktion auf den hormonellen Stimulus zeigte, führte der Einfluss von 3 nM E2 bei den SK-OV-3/*icb*KD-Zellen zu einer deutlichen Steigerung des Wachstums auf bis zu 170% der unbehandelten Kontrolle an Tag 7 ( $p = 0,0329$  vs. Kontrollklon) (vgl. Abb. 8).





**Abb. 9** Proliferationsexperimente zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von 17 $\beta$ -Östradiol. SK-OV-3 (a), MCF-7 (b) und HEC-1B (c) wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von 17 $\beta$ -Östradiol ( $3 \times 10^{-11}$  bis  $3 \times 10^{-8}$  M) stimuliert. Die Zahl stoffwechselaktiver Zellen wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels CTB-Assay an Tag 0 und 7 bestimmt. Die Daten werden in % der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle

In Dosis-Wirkungsanalysen zeigte sich eine nur geringe Wirkungszunahme bei steigenden Konzentrationen, wobei der maximale Effekt des Hormons auf den SK-OV-3/icbKD-Klon bei 3nM E2 eintrat. Hier erreichten die stimulierten icbKD-Zellen an Tag 7 ca. 200% der Zellzahl der Lösungsmittelkontrolle, während die Negativkontrollzellen auf keine Konzentration des Steroidhormons mit verstärktem Wachstum reagierten (s. Abb. 9).

Im Gegensatz dazu führte der *icb-1*-Knockdown bei MCF-7/icbKD in Bezug auf das Zellwachstum nicht zu einer eindeutigen Verstärkung der Östrogenantwort. Beide Klone der hormonsensiblen Zelllinie reagierten mit einer leichten Steigerung der Proliferation auf das Steroidhormon. Es zeigten sich etwas erhöhte Zellzahlen des icbKD-Klons verglichen mit der Negativkontrolle an Tag 5, wobei die icbKD-Zellen ca. 130% der unbehandelten Kontrolle erreichten, während die Negativkontrolle nur bei ca. 110% der unbehandelten Kontrolle lag (s. Abb. 8). Dieser Unterschied im Wachstum der beiden Klone erwies sich hierbei zwar als

statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ), bei entsprechenden Dosis-Wirkungsanalysen war allerdings im Gegensatz dazu ein etwas stärkerer Effekt auf die MCF-7/control-Zellen zu beobachten (s. Abb. 9): Es zeigte sich für den Kontrollklon eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung bis zu einem Maximum von ca. 190% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7 bei  $3 \times 10^{10}$  M, weitere Konzentrationssteigerungen konnten den Effekt nicht vergrößern. Auch der icbKD-Klon verhielt sich ähnlich, er reagierte aber insgesamt etwas schwächer, wobei der Unterschied nur bei niedrigeren Konzentrationen signifikant war (3 nM E2:  $p = 0,025$ ; 0,3 nM E2:  $p = 0,0028$ ; 0,003 nM E2:  $p = 0,046$ ). Bei Einsatz des Steroidhormons in der maximalen Dosis von 30 nM unterschied sich der icbKD-Klon nicht signifikant von der Negativkontrolle. Die Wirkung war ab  $3 \times 10^{10}$  M wie beim Kontrollklon nur geringfügig steigerbar, wobei der Maximalwert mit ca. 170% der Lösungsmittelkontrolle bei  $3 \times 10^8$  M erreicht wurde. In Zusammenschau der Ergebnisse der Proliferationsexperimente und der Dosis-Wirkungs-Analysen lässt sich somit kein eindeutiger Wachstumsvorteil eines Klons feststellen.

Bei der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B schließlich zeigten weder Kontrolle noch HEC-1B/icbKD Klon eine Wachstumssteigerung auf den Östrogenstimulus hin. Beide Klone erreichten nach Behandlung mit 3 nM E2 an Tag 7 nur ca. 110% der unbehandelten Kontrolle und auch die anderen eingesetzten Konzentrationen des Östradiols vermochten keine größere Wirkung zu erzielen (s. Abb. 8 und Abb. 9). Diese mangelnde Östrogenantwort wurde auch durch den Knockdown von *icb-1* nicht beeinflusst.

### **3.2.2.2. PPT und DPN**

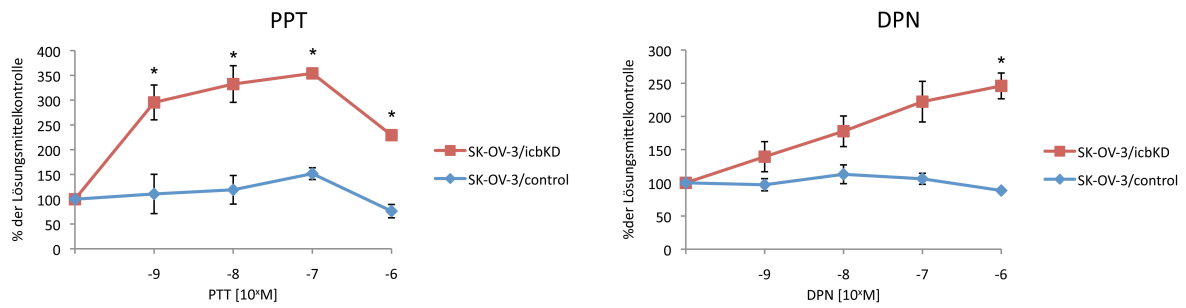
Um spezifisch durch ER $\alpha$  oder ER $\beta$  vermittelte Effekte bei der E2-getriggerten Proliferation unterscheiden zu können, wurden zudem Stimulationsexperimente mit dem ER $\alpha$ -Agonisten PPT und dem ER $\beta$ -Agonisten DPN durchgeführt. So sollte der Einfluss des Knockdowns von *icb-1* auf die für den entsprechenden Rezeptor spezifische Östrogenwirkung untersucht werden. Auch in diesen Versuchen zeigte sich durch den *icb-1*-Knockdown bedingt eine verstärkte Östrogenantwort der SK-OV-3/icbKD Zellen. Während das Wachstum der Negativkontrolle SK-OV-3 durch beide Substanzen nicht wesentlich beeinflusst wurde, beschleunigte sowohl die Behandlung mit PPT als auch mit DPN (1 nM - 1000 nM) das Wachstum der SK-OV-3/icbKD Zellen gegenüber dem Kontrollklon signifikant (s. Abb. 10). Dieser Effekt war bei selektiver Stimulation des ER $\alpha$  durch PPT stärker ausgeprägt und führte verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle zu einer Verdreifachung des Zellwachstums. Die Wirkung war im Bereich von 1 nM bis 100 nM zunächst dosisabhängig steigerbar bis auf einen Spitzenwert von ca. 350% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7, eine weitere Konzentrationserhöhung erzielte keine deutlicheren Effekte. Der ER $\beta$ -Agonist DPN zeigte eine geringere, jedoch ebenfalls dosisabhängige Steigerung des Zellwachstums von 150%

der Lösungsmittelkontrolle bei 1 nM DPN bis hin zu 250% der Lösungsmittelkontrolle (jeweils an Tag 7) bei der maximalen Konzentration von 1000 nM ( $p=0,042$  vs. Kontrollklon).

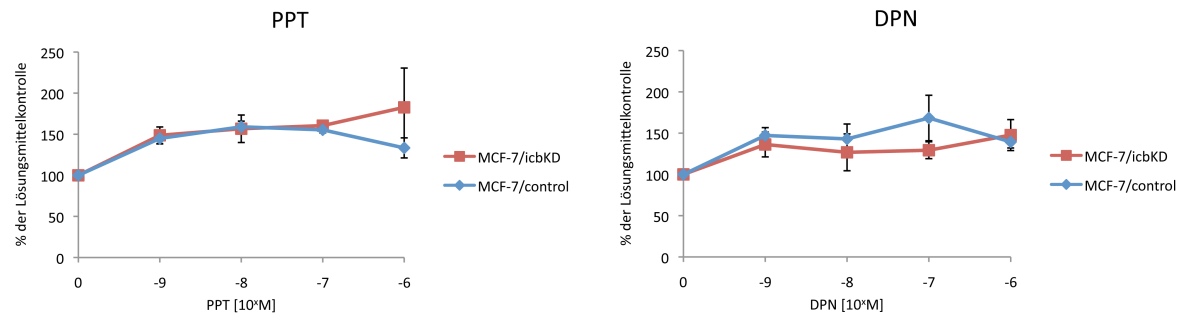
Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zeigten beide ER-Agonisten ebenfalls deutliche Effekte, die hier jedoch unabhängig von der *icb-1*-Expression waren. Es ergab sich bei beiden Klonen durch die Behandlung mit dem ER $\alpha$ -Agonisten PPT eine weitgehend dosisunabhängige Wachstumssteigerung von ca. 50% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (s. Abb. 10). Lediglich bei der höchsten Konzentration von PPT wichen die Klone im Wachstum voneinander ab, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu hatten wie schon bei den Versuchen mit Östradiol weder PPT noch DPN Einfluss auf das Zellwachstum der Endometriumkarzinomzellen HEC-1B. Die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen beider Substanzen bewirkte keine signifikante Proliferationssteigerung, es wurden maximal 110% der Lösungsmittelkontrolle erreicht. Auch hinsichtlich des *icb-1*-Knockdowns zeigte sich kein Effekt (s. Abb. 10).

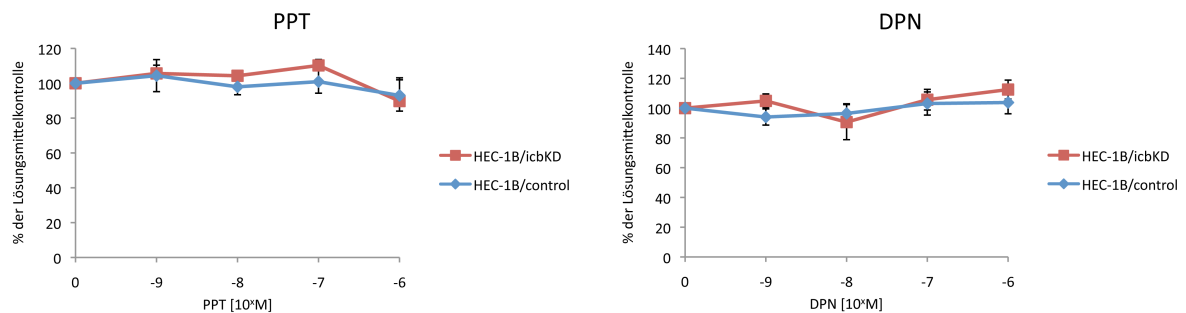
a)



b)



c)



**Abb. 10** Proliferationsexperimente zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von selektiven ER $\alpha$ - bzw. ER $\beta$ -Agonisten. Die entsprechenden Klone von SK-OV-3 (a), MCF-7 (b) und HEC-1B (c) wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen des ER $\alpha$ -Agonisten PPT ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) beziehungsweise des ER $\beta$ -Agonisten DPN ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) stimuliert. Die Zahl stoffwechselaktiver Zellen wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels CTB-Assay an Tag 0 und 7 bestimmt. Die Daten werden in % der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### **3.3.2.3. Proliferation unter Einfluss von Tamoxifen und ICI 182,780 und Rolle der Apoptose**

Zur weiteren Analyse der Rolle von *icb-1* im Östrogensystem und zur Bestätigung der Ergebnisse mit E2, wurden eine Reihe von Stimulationsexperimenten mit dem reinen Antiöstrogen ICI 182,780 (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) und 4-OH-Tamoxifen, dem aktiven Metaboliten des Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Tamoxifen (1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) durchgeführt. Die entsprechenden Versuche wurden einerseits in serumfreiem Medium ohne Östradiol durchgeführt, um einen östrogenunabhängigen Effekt der Substanzen zu ermitteln und andererseits in Kombination mit 3 nM E2, um die Wirkungsweise am ER in einem physiologischeren Kontext in Anwesenheit des Hormons zu untersuchen.

#### **3.3.2.3.1. SK-OV-3**

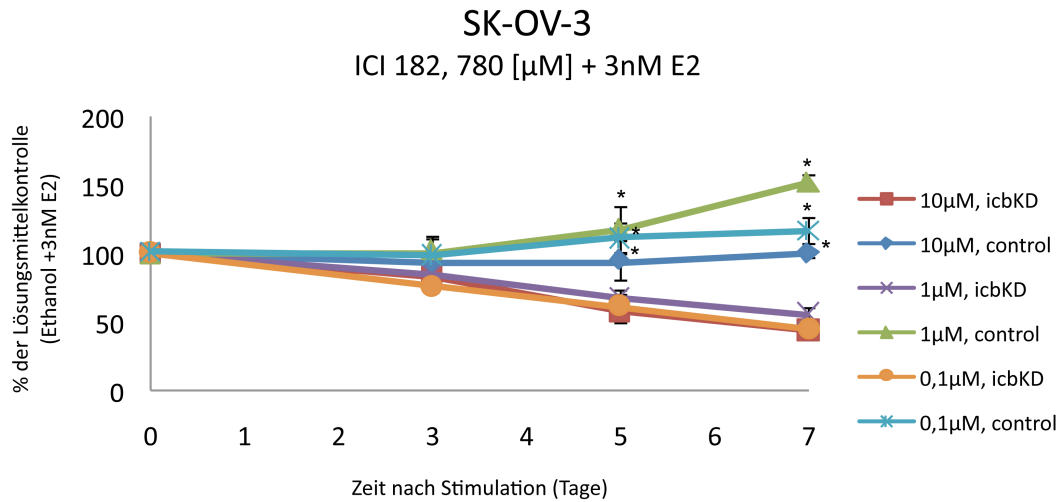
##### Proliferation in Reaktion auf 4-OH-Tamoxifen und ICI 182,780

Bei der Behandlung mit Antiöstrogenen bestätigten sich bei SK-OV-3/*icb*KD insgesamt deutliche östrogenabhängige Effekte. In den Experimenten mit ICI 182,780 in serumfreiem Medium ohne E2 ließ sich ein hormonunabhängiger, rein toxischen Einfluss des Östrogenantagonisten auf die Zellen ausschließen, da ungeachtet der Expression von *icb-1* bei keiner der verwendeten Konzentrationen von ICI 182,780 eine Wirkung auf die Ovarialkrebszellen zu beobachten war. In Kombination mit 3 nM E2 hingegen war ein Unterschied in Abhängigkeit von der Expression des Gens *icb-1* bemerkbar: Der Knockdown-Klon SKOV-3/*icb*KD wurde in Anwesenheit von E2 durch das Antiöstrogen deutlich in seinem hormonell stimulierten Wachstum gehemmt, während beim Kontrollklon kein entsprechender Effekt zu verzeichnen war. Die Kontrolle zeigte sowohl bei der höchsten Konzentration von ICI 182,780 (10  $\mu$ M + 3 nM E2) als auch bei der niedrigsten Konzentration (0,1  $\mu$ M + 3 nM E2) ein vergleichbares Proliferationsverhalten wie die Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 oder die unbehandelte Kontrolle, beziehungsweise bei 1  $\mu$ M ICI + 3nM E2 sogar eine leichte Wachstumssteigerung mit 150% ( $p=0,003$  vs. LMK + E2) der Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 an Tag 7. Das östrogenabhängige Wachstum der SK-OV-3/*icb*KD Zellen hingegen wurde durch alle Konzentrationen des Antiöstrogens stark gehemmt. Durch den Knockdown von *icb-1* kam es hier zu einer Reduktion der östrogenabhängigen Proliferation um ca. 60% an Tag 7 bei 10  $\mu$ M ICI 182, 780 + 3 nM E2 ( $p=0,005$  vs. LMK + 3 nM E2) und auch bei geringeren Konzentrationen war dieser Effekt vergleichbar. Die Klone unterschieden sich somit in Abhängigkeit von der *icb-1*-Expression deutlich in ihrer Reaktion auf das Antiöstrogen (an Tag 7: ICI 10  $\mu$ M:  $p=0,0029$ ; ICI 1  $\mu$ M:  $p=0,0018$ ; ICI 0,1  $\mu$ M:  $p=0,0090$ ; vs. Kontrolle).

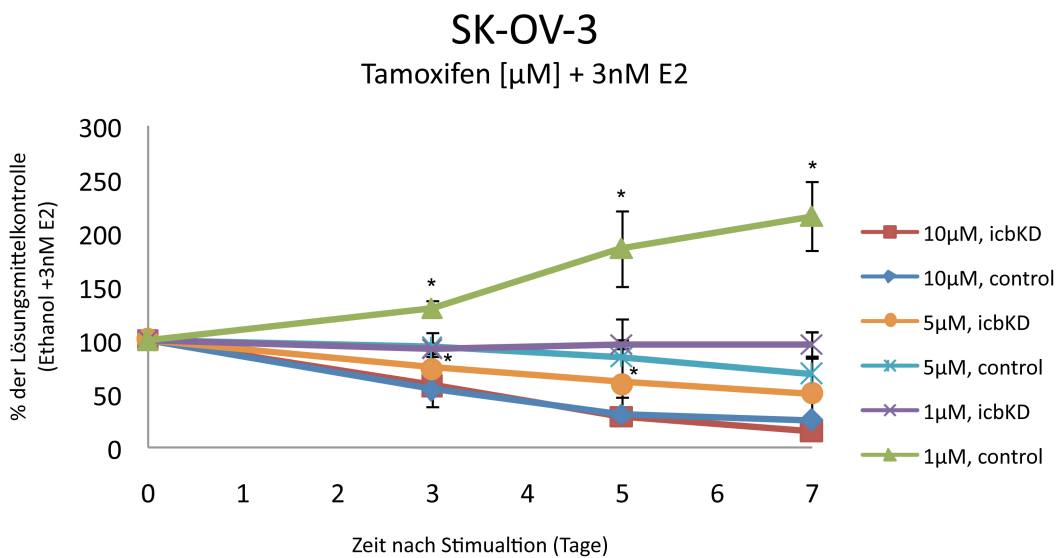
Auch in Bezug auf die Wirkung von 4-OH-Tamoxifen zeigten sich Differenzen zwischen dem SK-OV-3/icbKD-Klon und der Kontrolle, hier vor Allem bei niedrigeren Konzentrationen der Substanz. Bei den höheren Konzentrationen hingegen stand bei beiden Klonen die toxische, östrogenunabhängige Wirkung des SERMs im Vordergrund: Sowohl in steroidfreiem Medium als auch in Anwesenheit von 3 nM E2 führte die Substanz zu einer starken Wachstumsreduktion um bis zu 90% (10 µM Tamoxifen,  $p=0,006$  vs. LMK) bzw. 80% (10 µM Tamoxifen + 3 nM E2,  $p=0,002$  vs. LMK + 3 nM E2) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7. Auch bei einer Konzentration von 5 µM spielte dieser toxische Effekt, wenngleich geringer, eine Rolle. In steroidfreiem Medium war hier die Wirkung auf die SK-OV-3/icbKD Zellen signifikant schwächer ausgeprägt (Tag 5:  $p=0,0035$  und Tag 7:  $p<0,0001$ , vs. Kontrollklon), während die Knockdownzellen in Gegenwart von Östrogenen stärker mit einer Wachstumshemmung auf die Substanz ansprachen als die Negativkontrolle (Tag 3:  $p=0,0038$  und Tag 5:  $p=0,024$ , vs. Kontrollklon), was für einen zusätzlichen östrogenabhängigen Effekt spricht.

Bei einer geringen Konzentration von 1 µM ließ sich das östrogenabhängige Verhalten der SK-OV-3/icbKD Zellen allerdings am Besten beobachten. Hier zeigte 4-OH-Tamoxifen keine toxischen Effekte und beeinflusste somit das Wachstum der Zellen in steroidfreiem Medium nicht wesentlich, die Tendenz zur Wachstumssteigerung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle war statistisch nicht signifikant. In östrogenhaltigem Medium wiederum war dieser eventuell proliferationsverstärkende Effekt schwach signifikant nur bei der Negativkontrolle zu beobachten (Tag 3:  $p=0,018$  und Tag 7:  $p=0,025$ , vs. LMK + E2), bei den SK-OV-3/icbKD-Zellen jedoch verhinderte die Substanz ein hormonell verstärktes Zellwachstum (Tag 3:  $p=0,0259$ ; Tag 5:  $p=0,0471$ ; Tag 7:  $p=0,0156$ , jeweils vs. Kontrollklon) und war somit in der Lage, die Östrogenwirkung erfolgreich zu antagonisieren (s. Abb. 11).

a)



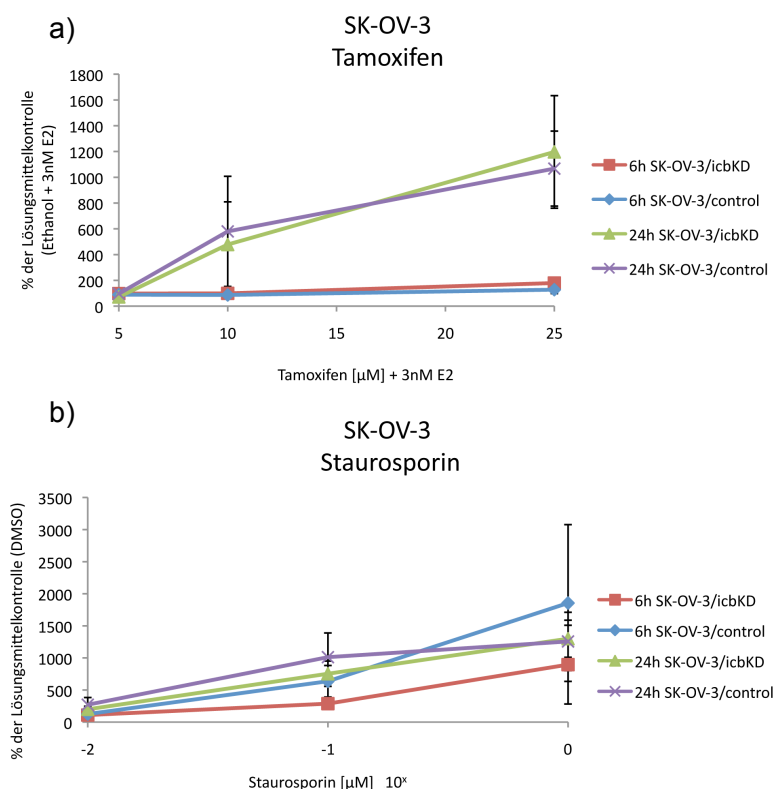
b)



**Abb. 11** Proliferation der SK-OV-3-Klone in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3 nM E2 (a) und das reine Antiöstrogen ICI 182,780 in Kombination mit 3 nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1 x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von 4-OH-Tamoxifen (1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) + 3nM E2 bzw. ICI 182, 780 (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) + 3 nM E2 behandelt. Das Zellwachstum wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 5 und 7 bestimmt. Die Daten werden in % der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

## Rolle der Apoptose

Um unterscheiden zu können, inwieweit die Zellzahlminderung auf die östrogenantagonistische Proliferationshemmung beziehungsweise auf Apoptose zurückzuführen war, und um eventuelle Auswirkungen des *icb-1*-Knockdowns auf den zellulären Prozess des programmierten Zelltodes feststellen zu können, wurden eine Reihe von Apoptoseassays durchgeführt. Hierbei wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 luminometrisch nach 5 h beziehungsweise 24 h gemessen. Da die stärksten Effekte bei den Proliferationsexperimenten mit Tamoxifen erzielt wurden, wurde diese Substanz (in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ) in Kombination mit 3nM E2 exemplarisch für die kurze Versuchsreihe ausgewählt. Die Apoptose-induzierende Substanz Staurosporin (in den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) diente hierbei als Positivkontrolle. Zum Vergleich wurden für die Experimente ebenfalls eine unbehandelte Kontrolle in 1x SR2, eine Kontrolle mit 3 nM E2 sowie Lösungsmittelkontrollen (Ethanol + 3 nM E2 für Tamoxifen und DMSO für Staurosporin) verwendet.



**Abb. 12** Messung der Apoptose der SK-OV-3-Klone in Reaktion auf die Positivkontrolle Staurosporin (a) und in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3 nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von Staurosporin (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) bzw. 4-OH-Tamoxifen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) + 3 nM E2 behandelt. Die Apoptose wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels Caspase-Glo™ 3/7 Assay nach 6 und 24 h bestimmt. Die Daten werden in % der Lösungsmittelkontrolle DMSO (b) oder der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 (a) dargestellt. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle.

Bei beiden SK-OV-3-Klonen ließ sich durch die Positivkontrolle Staurosporin Apoptose induzieren und nachweisen. Die Wirkung war konzentrationsabhängig steigerbar mit Maximalwerten von 1850% der Lösungsmittelkontrolle für SK-OV-3/icbKD nach 5 h, wobei der Effekt bei den niedrigeren Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ) nach 24 h deutlicher



ausgeprägt war als zum früheren Messzeitpunkt. Zudem zeigte sich ein Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die Apoptose. Dies war besonders nach 5 h bei höheren Konzentrationen von Staurosporin zu beobachten. Hier gingen signifikant weniger Zellen des *icb-1*-Knockdownklons in Apoptose: Die Caspase-Aktivität betrug nur 40% (Staurosporin 0,1  $\mu$ M:  $p=0,02$ ) bzw. 50% (Staurosporin 1  $\mu$ M:  $p=0,01$ ) der Aktivität der Negativkontrollzellen. Dieser Effekt war nach 24 h noch nachvollziehbar, jedoch geringer ausgeprägt (Staurosporin 0,01  $\mu$ M:  $p=0,09$ ; Staurosporin 0,1  $\mu$ M:  $p=0,02$ ) (s. Abb. 12).

Auch durch die Behandlung mit hoch konzentriertem 4-OH-Tamoxifen wurde Apoptose ausgelöst, wobei starke Effekte erst nach 24 h beobachtet wurden. Nach 5 h war bei 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 keine proapoptotische Wirkung festzustellen, lediglich bei der maximalen Konzentration von 25  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 betrug die Caspaseaktivität ca. 130% (SK-OV-3) beziehungsweise 180% (SK-OV-3/*icb*KD) der Lösungsmittelkontrolle - dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach 24 h war die Caspase-Aktivität bei 25  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 deutlich auf 1070% der Lösungsmittelkontrolle (SK-OV-3) beziehungsweise 1200% (SK-OV-3/*icb*KD) gestiegen. Auch bei 10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 war ein deutlicher Caspase-Anstieg auf 580% (SK-OV-3) und 480% (SK-OV-3/*icb*KD) der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle zu beobachten, der auch zu der starken Reduktion der Zellzahl in den Stimulationsexperimenten beigetragen haben wird. Bei der niedrigsten Konzentration des SERMs (5  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) konnte wiederum keine Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen werden (s. Abb. 12).

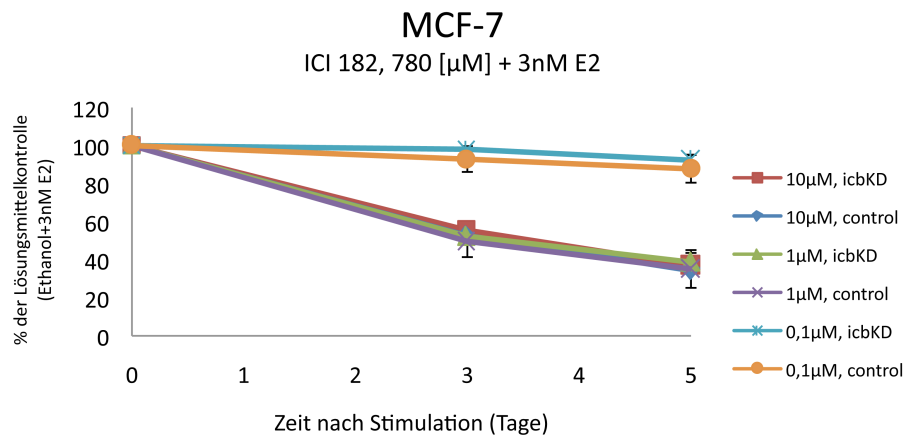
### **3.3.2.3.2.MCF-7**

#### Proliferation in Reaktion auf 4-OH-Tamoxifen und ICI 182,780

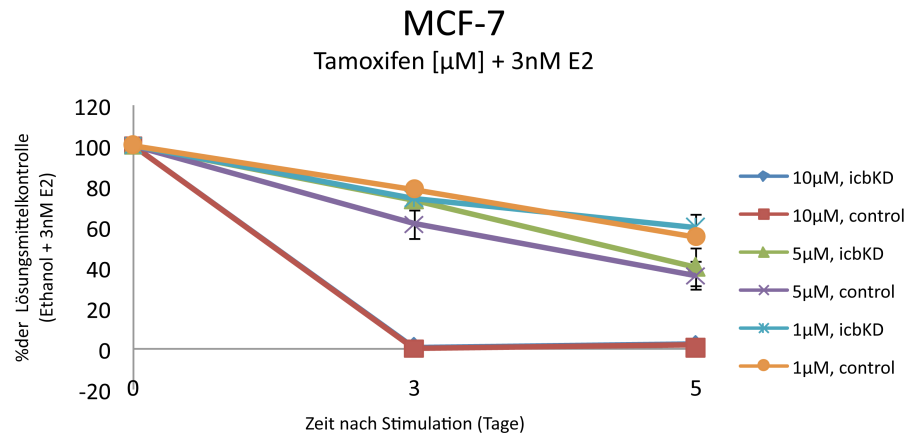
Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit SK-OV-3/*icb*KD zeigte sich bei den MCF-7/*icb*KD Zellen in der Reaktion auf das Antiöstrogen ICI 182,780 und den SERM 4-OH-Tamoxifen kein signifikanter Effekt des *icb-1*-Knockdowns. Die proliferationshemmende Wirkung von ICI 182,780 auf MCF-7/*icb*KD und die Negativkontrolle MCF-7 führte zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion des Zellwachstums um bis zu 50% in steroidfreiem Medium (10  $\mu$ M ICI,  $p=0,001$ ), was somit als östrogenunabhängiger Effekt zu werten ist. In Gegenwart von Östradiol hingegen wurde das Wachstum sogar um bis zu 70% (10  $\mu$ M ICI + 3 nM E2,  $p<0,001$ ) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 reduziert. Es war jedoch kein Unterschied in Abhängigkeit von der Expression des Gens *icb-1* zu beobachten. Bei der Behandlung mit dem SERM 4-OH-Tamoxifen war ein noch stärkerer konzentrationsabhängiger, wachstumshemmender Effekt feststellbar, der jedoch wiederum nicht durch den Knockdown von *icb-1* beeinflusst wurde. Zunächst ließ sich bei höheren Konzentrationen in steroidfreiem Medium eine östrogenunabhängige, deutlich zytotoxische

Wirkung nachweisen. Die relative Zellzahl wurde bei 10  $\mu\text{M}$  schon an Tag 3 auf ca. 1% der Lösungsmittelkontrolle reduziert ( $p < 0,001$  vs. LMK), bei 5  $\mu\text{M}$  trat der Effekt langsamer ein, bis ein finaler Wert von ca. 5% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7 erreicht war ( $p < 0,001$  vs. LMK). Niedrigere Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  erzielten einen entsprechend geringeren Effekt mit ca. 70% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7 ( $p = 0,002$  vs. LMK).

a)



b)

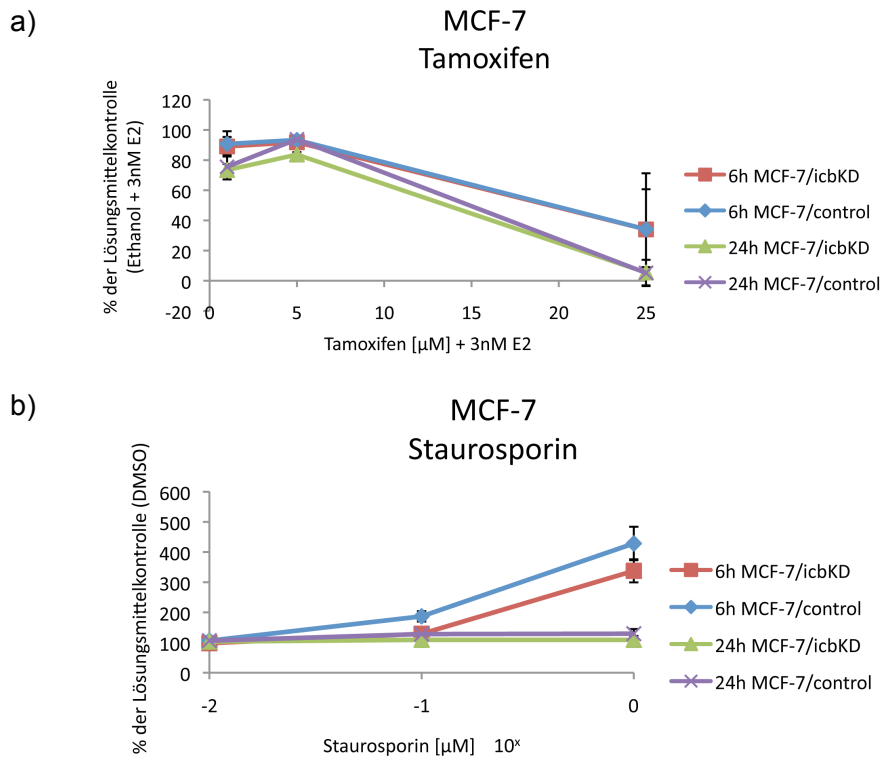


**Abb. 13** Proliferation der MCF-7-Klone in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3 nM E2 (a) und das reine Antiöstrogen ICI 182,780 in Kombination mit 3 nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1xSR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von 4-OH-Tamoxifen (1  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ) + 3 nM E2 bzw. ICI 182, 780 (0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ) + 3 nM E2 behandelt. Das Zellwachstum wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 5 bestimmt. Die Daten werden in % der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle.

In östrogenhaltigem Medium ließ sich vor Allem bei niedrigen Konzentrationen auch bei der Mammakarzinomzelllinie eine veränderte Wirkung des SERMs nachvollziehen. In geringen Dosen ließ sich eine additive östrogenabhängige Proliferationshemmung durch den SERM nachvollziehen, da die Zellzahl stärker als in Abwesenheit von E2 auf bis zu 55% an Tag 5 (1  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2,  $p=0,009$  vs. LMK + 3 nM E2) vermindert wurde. Im Gegensatz dazu veränderte der Zusatz von 3 nM E2 bei hoher Dosierung (10  $\mu$ M 4-OH-Tamoxifen) den stark hemmenden Effekt der Substanz kaum, es ergaben sich wiederum Werte von ca. 1% der Lösungsmittelkontrolle ab Tag 3 (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2,  $p=0,001$ ). Auch bei 5  $\mu$ M Tamoxifen wurde die Wirkung in Gegenwart von E2 nur gering vermindert, es verblieben ca. 20% der Lösungsmittelkontrolle (5  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2,  $p<0,001$ ) an Tag 6 (40% an Tag 5,  $p=0,001$ ). Bei keiner der beiden Substanzen gleich welcher Konzentration wurde der Effekt jedoch eindeutig durch die Expression von *icb-1* beeinflusst (s. Abb. 13).

### Rolle der Apoptose

Auch bei der Mammakarzinomzelllinie wurde ergänzend die Rolle der Apoptose in der Vermittlung der Wirkung von Tamoxifen untersucht. Bei MCF-7 konnte zwar durch die Positivkontrolle Staurosporin wiederum dosisabhängig Apoptose induziert werden, jedoch war der Effekt hier deutlich geringer ausgeprägt als bei SK-OV-3. Die Maximalwerte von 430% der Lösungsmittelkontrolle DMSO (MCF-7) bzw. 340% (MCF-7/*icb*KD) bei 1  $\mu$ M Staurosporin wurden schon nach 5h erreicht. Es war wieder eine etwas schwächere Wirkung auf den Knockdownklon nachzuvollziehen, der Unterschied zwischen den Klonen war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als bei SK-OV-3/*icb*KD und der entsprechenden Negativkontrolle und nur bei 0,1  $\mu$ M Staurosporin nach 5 h schwach signifikant ( $p=0,036$ ). Für Tamoxifen + 3 nM E2 konnte zu beiden Zeitpunkten unabhängig von der Konzentration keine eindeutig apoptoseinduzierende Wirkung nachgewiesen werden, bei der maximalen Konzentration von 25  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 lag die Caspaseaktivität sogar deutlich niedriger bei ca. 30% der Lösungsmittelkontrolle nach 5 h und nur 5% nach 24 h. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die entsprechenden Prozesse schon zu einem früheren Zeitpunkten abgelaufen waren und durch die Messungen nicht mehr erfasst werden konnten. Ein Unterschied aufgrund des Knockdowns von *icb-1* war hier nicht zu beobachten (s. Abb.14).



**Abb. 14** Messung der Apoptose der MCF-7-Klone in Reaktion auf die Positivkontrolle Staurosporin (a) und in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3 nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von Staurosporin (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM) bzw. 4-OH-Tamoxifen (1 µM, 10 µM, 25 µM) + 3 nM E2 behandelt. Die Apoptose wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels Caspase-Glo™ 3/7 Assay nach 6 und 24 h bestimmt. Die Daten werden in % der Lösungsmittelkontrolle DMSO (b) oder der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 (a) dargestellt. \*p<0,05 versus Kontrolle.

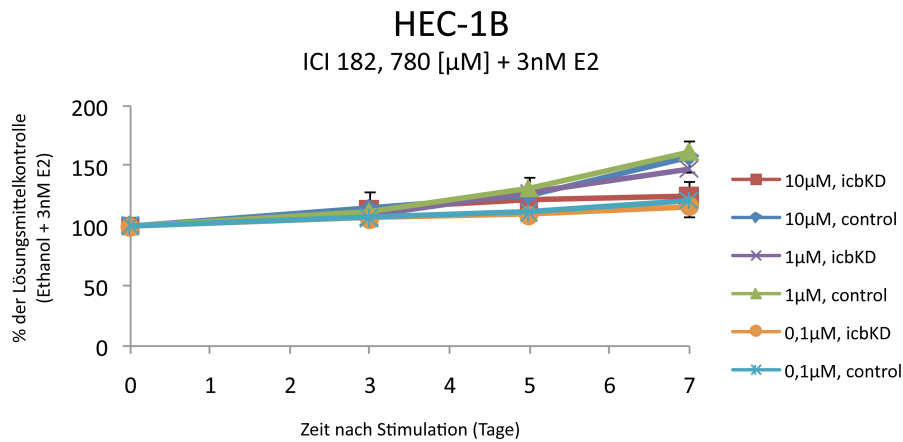
### 3.3.2.3.3. HEC-1B

#### Proliferation in Reaktion auf 4-OH-Tamoxifen und ICI 182,780

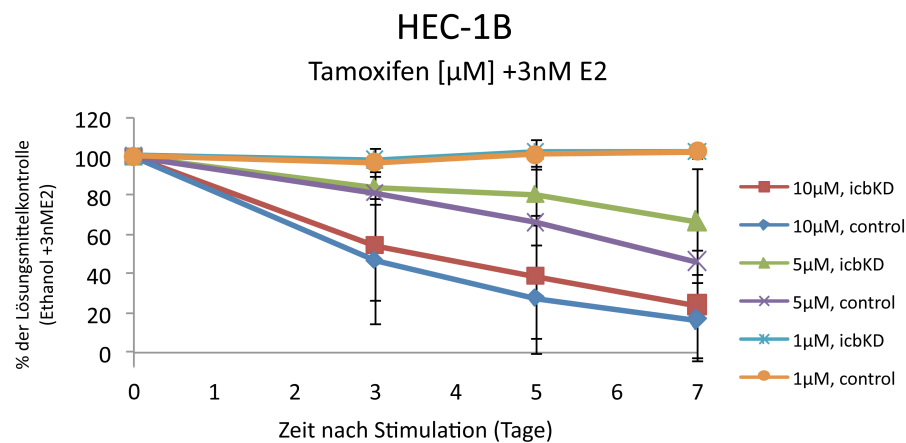
Ebenso wie bei der Mammakarzinomzelllinie hatte der Knockdown von *icb-1* bei der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B keinen Einfluss auf die Wirkung der Antiöstrogene. Trotz der vorher beobachteten fehlenden Östrogenwirkung auf die Zelllinie führte jedoch das als reines Antiöstrogen beschriebene ICI 182,780 zu einer dosisabhängigen Wachstumssteigerung bei beiden Klonen. Diese ist, da sie sowohl in Abwesenheit von Östrogenen wie auch in Gegenwart von 3 nM E2 zu beobachten war, als östrogenunabhängig zu sehen. Die höchste Konzentration von 10 µM bewirkte eine Steigerung des Wachstums gegenüber der Lösungsmittelkontrolle um bis zu 90% an Tag 7 in östrogenfreiem Medium (HEC-1B/*icb*KD:  $p=0,018$ ) bzw. um bis zu 70% bei Versuchen in Kombination mit 3 nM E2 (Kontrollklon:  $p=0,017$ ). Auch bei 1 µM war der Effekt vergleichbar ausgeprägt (Kontrollklon: 160%;  $p=0,012$  bzw. HEC-1B/*icb*KD: 150%;  $p=0,046$ ), erst bei 0,1 µM war die Wirkung deutlich geringer mit maximalen Werten von ca. 120% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 7 sowohl in östrogenhaltigem als auch in steroidfreiem Medium. Die jeweiligen Werte der Negativkontrolle HEC-1B und des Knockdownklons HEC-1B/*icb*KD unterschieden sich jedoch nicht wesentlich.

Der SERM Tamoxifen hingegen, dem am Endometrium eine agonistische Funktion zugesprochen wird, hatte abgesehen von einer toxischen Wirkung in höheren Dosen unabhängig vom Östrogengehalt der Umgebung keinen Effekt auf die Zellen beider Klone. Bei der maximalen Konzentrationen von 10 µM 4-OH-Tamoxifen ließ sich in steroidfreiem Medium eine Wachstumsreduktion um bis zu 60% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ( $p=0,013$ ), in Gegenwart von 3 nM E2 um bis zu 80% ( $p=0,005$ ) beobachten, die jedoch nicht wesentlich durch den Knockdown von *icb-1* beeinflusst wurde. Auch bei 5 µM zeigte sich sowohl in Abwesenheit wie auch in Gegenwart von Östradiol eine geringere dosisabhängige Hemmung des Wachstums mit etwas schwächerem Effekt auf die HEC-1B/*icb*KD-Zellen (Tag 5:  $p=0,025$  u. Tag 7:  $p=0,002$  vs. Kontrollklon). In niedrigeren Konzentrationen hatte die Substanz keinen Effekt auf das Zellwachstum (s. Abb. 15).

a)



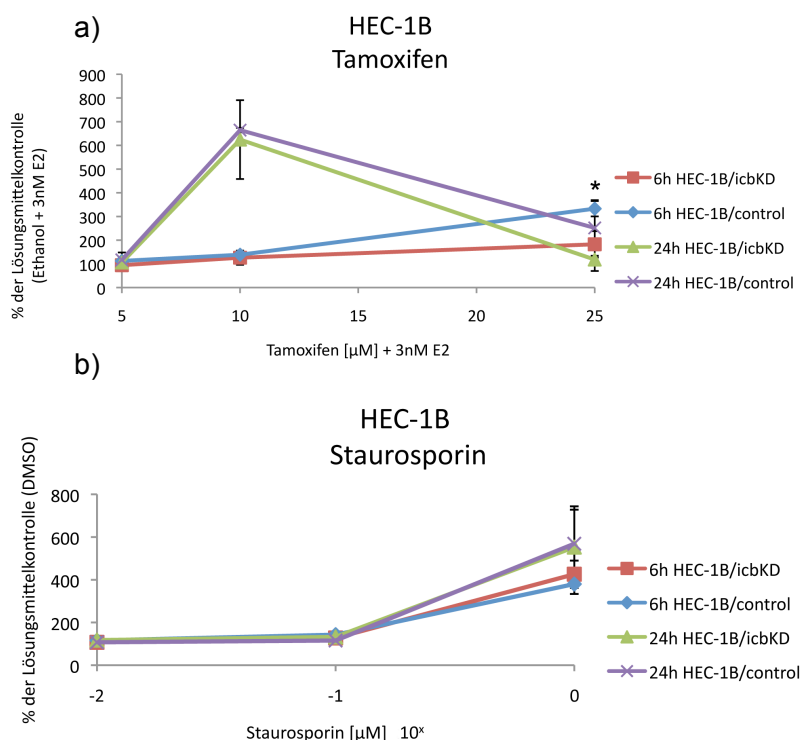
b)



**Abb. 15** Proliferation der HEC-1B-Klone in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3nM E2 (a) und das reine Antiöstrogen ICI 182,780 in Kombination mit 3nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von 4-OH-Tamoxifen (1  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ) + 3 nM E2 bzw. ICI 182, 780 (0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ) + 3nM E2 behandelt. Das Zellwachstum wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 5 und 7 bestimmt. Die Daten werden in % der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle.

## Rolle der Apoptose

Bei HEC-1B folgten ebenfalls ergänzende Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose für die Wirkung von Tamoxifen. Mit der Positivkontrolle Staurosporin ließ sich dosisabhängig Apoptose induzieren, wobei deutlich erhöhte Caspase-Werte nur bei der Maximalkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin nachgewiesen wurden. Nach 5 h waren 380% (HEC-1B) bzw. 420% (HEC-1B/icbKD) der Lösungsmittelkontrolle erreicht, nach 24 h stiegen die Werte noch weiter auf ca. 620% (HEC-1B) bzw. 660% (HEC-1B/icbKD) der Lösungsmittelkontrolle. Die geringen Unterschiede hinsichtlich der Expression von *icb-1* waren nicht signifikant (s. Abb. 16).



**Abb. 16** Messung der Apoptose der HEC-1B-Klone in Reaktion auf die Positivkontrolle Staurosporin (a) und in Reaktion auf den SERM Tamoxifen in Kombination mit 3 nM E2 (b). Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 1x SR2 kultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen von Staurosporin (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) bzw. 4-OH-Tamoxifen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) + 3 nM E2 behandelt. Die Apoptose wurde wie in Material und Methoden beschrieben mittels Caspase-Glo™ 3/7 Assay nach 6 und 24 h bestimmt. Die Daten werden in % der Lösungsmittelkontrolle DMSO (b) oder der ethanolhaltigen Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 (a) dargestellt. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle.

Auch der SERM 4-OH-Tamoxifen war in höheren Konzentrationen in der Lage, sowohl bei der Negativkontrolle HEC-1B als auch bei HEC-1B/icbKD Apoptose zu induzieren. Nach 5 h war ein deutlicher Effekt nur bei der Maximalkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  Tamoxifen + 3 nM E2 zu beobachten. Dabei wurde eine Caspase-Aktivität von 330% (HEC-1B) beziehungsweise 180% der Lösungsmittelkontrolle (HEC-1B/icbKD) gemessen, womit beim Knockdownklon in Reaktion auf den SERM signifikant weniger Zellen in Apoptose gingen ( $p = 0,0017$  vs. Negativkontrolle). Bei 10  $\mu\text{M}$  Tamoxifen + 3 nM E2 war die proapoptotische Wirkung nach 5 h nur gering ausgeprägt mit 140% (HEC-1B) bzw. 130% (HEC-1B/icbKD) der Lösungsmittelkontrolle während bei 5  $\mu\text{M}$  + 3 nM E2 Tamoxifen keine erhöhte Caspaseaktivität gemessen wurde. Nach 24 h war ein deutlicher Anstieg der Caspasewerte

wiederum nur bei den höheren Konzentrationen 10  $\mu$ M Tamoxifen und 25  $\mu$ M Tamoxifen festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt wurden Spitzenwerte von 660% (HEC-1B) bzw. 620% (HEC-1B/icbKD) der Lösungsmittelkontrolle bei 10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 erreicht, während die Wirkung bei 25  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 mit 250% (HEC-1B) und 120% (HEC-1B/icbKD) schon schwächer ausfiel. Anhand dieser Werte lässt sich ein *icb-1*-abhängiger Unterschied in der Wirkung des SERMs auf die Endometriumkarzinomzellen nachvollziehen. Durch den Knockdown des Gens scheint die Induktion von Apoptose durch Tamoxifen vermindert zu werden, was am deutlichsten bei 25  $\mu$ M Tamoxifen nachzuvollziehen war. Hier war die Caspase-Aktivität der Knockdownzellen HEC-1B/icbKD mit nur ca. 40% (5 h;  $p=0,014$ ) bzw. 50% (24 h;  $p=0,007$ ) der Negativkontrolle HEC-1B (HEC1B/icbKD definiert als 100%) signifikant vermindert.



### 3.3. Veränderung der Genexpression durch den Knockdown von *icb-1*

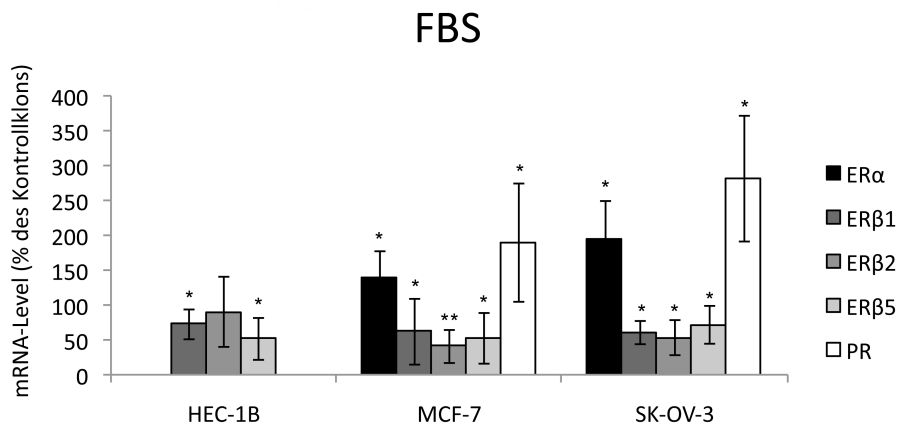
In den Proliferationsexperimenten hatten sich Hinweise auf eine Rolle von *icb-1* bei der Östrogenantwort ergeben. Vor Allem die ursprünglich hormonresistente Ovarialkrebszelllinie SK-OV-3 zeigte nach dem Knockdown des Gens ein östrogensensibles Verhalten. Deshalb war es von großem Interesse, zu sehen, welche Veränderungen diesem Effekt auf Ebene der Genexpression zugrunde liegen könnten. Auch bestand die Möglichkeit, dass der Knockdown bei den anderen beiden Zelllinien zumindest auf Transkriptionsebene einen Einfluss hatte.

Zur genaueren Analyse der zellulären Östrogenantwort wurde einerseits die Expression des Steroidhormonrezeptors ER $\alpha$ , der verschiedenen ER $\beta$ -Subtypen (ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5) und des Progesteronrezeptors (PR) mittels real-time RT-PCR untersucht. Um die molekularen Mechanismen, die zu den beobachteten Veränderungen der Proliferation geführt hatten, näher zu erfassen, wurde außerdem die Expression der östrogenabhängigen Zellzyklusregulatoren *Cyclin D1*, *Cyclin A2*, *Cyclin Dependent Kinase 2* (CDK2), *FOS* und *CDKN1A* (*p21/WAF-1*) in den Klonen der jeweiligen Zelllinien verglichen. Zur Bestätigung der Rolle von *icb-1* bei Differenzierungsprozessen wurden schließlich die mRNA-Level von Genen untersucht, die in Verbindung mit der Differenzierung von Mamma-, Ovarial- oder Endometriumkarzinomzellen gebracht wurden - darunter der Epithelzellmarker *Zytokeratin 8* (*KRT8*), das für ein Extrazellulärmatrixprotein kodierende Fibulin 1c (*FBLN1*, hier abgekürzt *FIB1c*) und *Laktalbumin* (*LALBA*). Weiterhin fielen darunter *KAL-1*, das für ein der Zelladhäsion dienendes Glykoprotein kodiert, und *Growth Factor Independent 1* (*GFI1*), ein die Transkription regulierendes Proto-Onkogen.

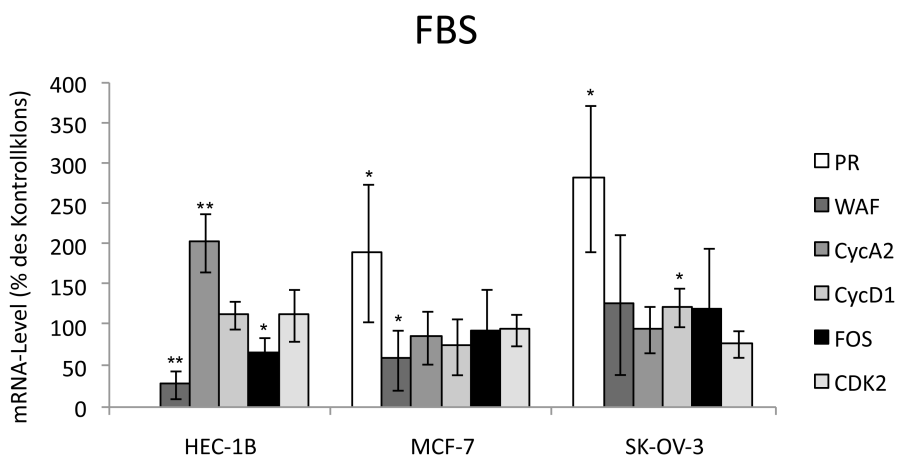
#### 3.3.1. Genexpression unter serumhaltigen Kulturbedingungen (DMEM/F12 + 10%FBS)

Zunächst wurde die Genexpression in Standardzellkulturmedium mit 10% FBS ohne Zusatz von Stimulantien untersucht. Der Knockdown von *icb-1* führte zu einem signifikant erhöhten ER $\alpha$ -mRNA-Level sowohl in MCF-7- als auch in SK-OV-3-Zellen. Bei den SK-OV-3/*icb*KD-Zellen betrug die Expression von ER $\alpha$  annähernd das Doppelte der bei der Negativkontrolle gemessenen Werte ( $p=0,007$ ), wohingegen bei den MCF-7/*icb*KD-Zellen eine Steigerung von ca. 40% beobachtet wurde ( $p=0,001$ ). Dies spiegelte sich auch in den mRNA-Werten des ER $\alpha$ -Zielgens PR wider, die bei den SK-OV-3/*icb*KD-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle auf etwa das Dreifache ( $p=0,028$ ) und bei MCF-7/*icb*KD immerhin noch auf 170% erhöht waren ( $p=0,002$ ). Bei HEC-1B konnte unabhängig von der *icb-1*-Expression weder ER $\alpha$  noch PR nachgewiesen werden (s. Abb.17).

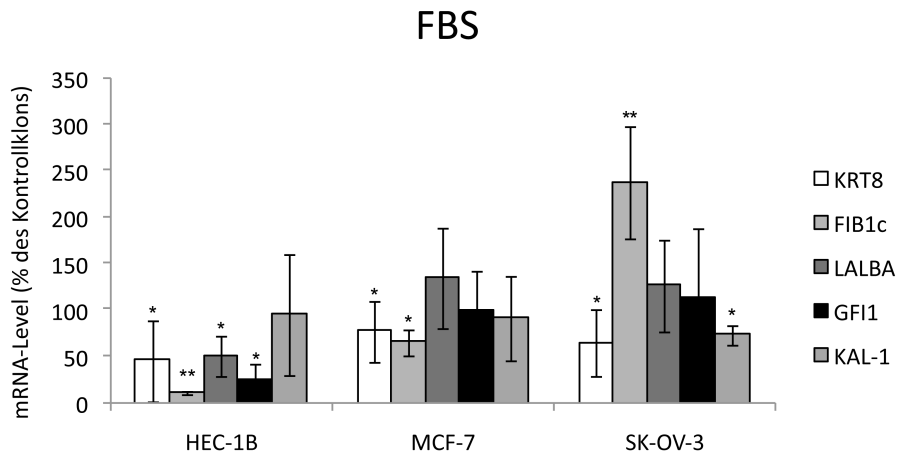
a)



b)



c)



**Abb. 17** Durch den Knockdown von *icb-1* bedingte Änderungen der Genexpression in serumhaltigem Kulturmedium (DMEM/F12 + 10% FBS) wie mittels real-time-RT-PCR nachgewiesen. Die Transkript-Level der Hormonrezeptoren (a), östrogenresponsiven Genen und Zellzyklusregulatoren (b) und Genen, die mit Differenzierung in Verbindung stehen (c) werden in % der Negativkontrollklone dargestellt, die als 100% definiert wurden. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  versus Kontrolle bzw. 100%.

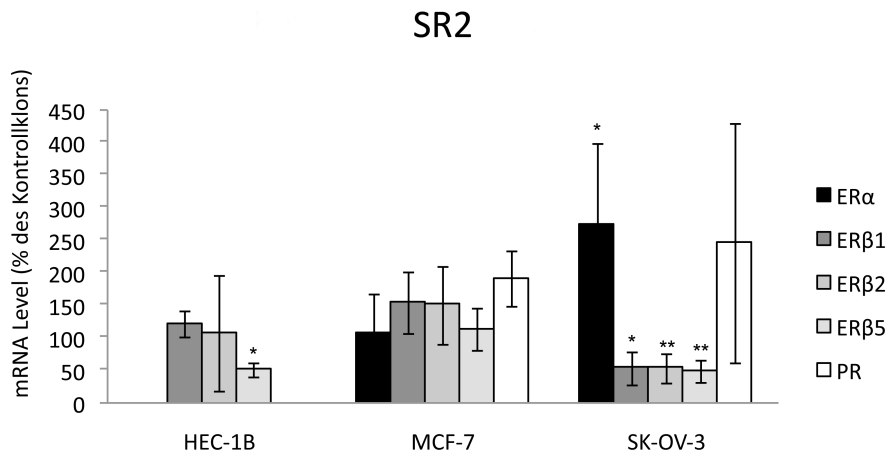
Im Gegensatz dazu war die Expression der ER $\beta$  Isoformen in allen Zelllinien erniedrigt. Die ER $\beta$  Isoform 1 war auf 60% der Negativkontrolle (SK-OV-3/icbKD:  $p=0,006$ ) beziehungsweise 66% (MCF-7/icbKD:  $p=0,023$ ) und 72% (HEC-1B/icbKD:  $p=0,044$ ) reduziert. Auch bei ER $\beta$  Isoform 2 war das mRNA-Level der Zelllinien vermindert, so wurde bei SK-OV-3/icbKD nur etwa 50% der Negativkontrolle, bei MCF-7 40% ( $p<0,001$ ) und bei HEC-1B 90% (n.s.) gemessen. Ebenso war eine geringere Expression der ER $\beta$  Isoform 5 zu beobachten, die mit 44% der Negativkontrolle besonders ausgeprägt bei HEC-1B/icbKD zu beobachten war ( $p=0,003$ ). Allerdings zeigten auch MCF-7/icbKD mit ca. 50% ( $p=0,001$ ) und SK-OV-3 mit etwa 70% der Negativkontrolle ( $p=0,032$ ) diese Tendenz (s. Abb.17).

Weiterhin wurden bei den Zellzyklusregulatoren und Differenzierungsgenen einige Zelltyp-spezifische Effekte des Knockdowns festgestellt, auf die nun im Einzelnen eingegangen werden soll. Bei den SK-OV-3/icbKD Zellen war die Expression des Epithelzellmarkers *Zytokeratin 8 (KRT8)* gegenüber der Negativkontrolle signifikant ( $p=0,002$ ) auf ca. 65% vermindert, ebenso *KAL-1* auf ca. 70% ( $p<0,001$ ). Dagegen war die mRNA für das in Ovarialkarzinomzellen sezernierte EZM-Protein Fibulin 1c (FIB1c) auf mehr als das Doppelte erhöht ( $p<0,001$ ). Die anderen Parameter blieben vom *icb-1*-Knockdown relativ unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu fiel beim MCF-7/icbKD-Klon neben einer entsprechenden Erniedrigung der Expression von *KRT8* auf ca. 75% ( $p=0,036$ ) sowie von *Fibulin 1c* auf ca. 65% der Negativkontrolle ( $p=0,001$ ) (s. Abb. 17c), außerdem eine mit ca. 60% der Negativkontrolle signifikant ( $p=0,005$ ) verringerte Transkriptkopien des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF1* auf (s. Abb.17b). Ebenso war diese verminderte Expression von *p21/WAF1* bei den HEC-1B/icbKD-Zellen zu beobachten - hier betrug sie nur ca. 30% der Negativkontrolle ( $p<0,001$ ). Diese Reduktion eines den Zellzyklus hemmenden Faktors ging jedoch bei den Endometriumkarzinomzellen mit einer Verdopplung des positiven Zellzyklusregulators *Cyclin A2* ( $p<0,001$ ) einher (s. Abb. 17b). Auch einige Differenzierungsmarker waren bei dieser Zelllinie durch den Knockdown verändert: Die Expression von *Fibulin 1c* war im Gegensatz zu den SK-OV-3/icbKD Zellen im HEC-1B/icbKD-Klon deutlich auf nur 10% reduziert ( $p<0,001$ ), die Expression von *KRT8* mit nur etwa 30% der Negativkontrolle noch stärker vermindert als bei den Ovarialkarzinomzellen ( $p=0,005$ ). Auch *Laktalbumin-(LALBA)*-mRNA wurde im icbKD-Klon um 50% vermindert detektiert ( $p=0,002$ ). Jedoch war neben der Reduktion der Differenzierungsmarker auch die Down-Regulation des Onkogens *GFI1* auf ca. 25% ( $p<0,001$ ) zu beobachten (s. Abb.17c). Auch ließ sich eine leichte Reduktion von *FOS* auf etwa 65% des Negativkontrollklons feststellen ( $p=0,001$ ) (s. Abb.17b).

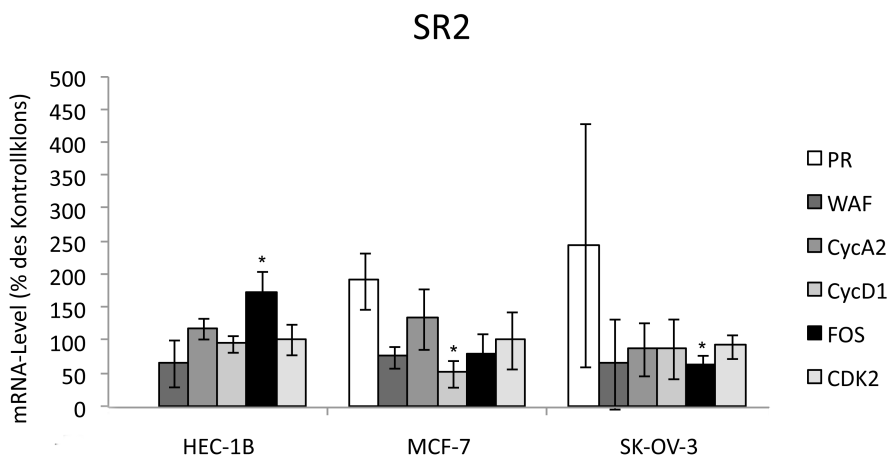
### 3.3.2. Expression in serumfreiem Medium (DMEM/F12 + 1x SR2)

Um die Genexpression frei von möglichen Einflüssen des Zusatzes FBS untersuchen zu können, wurde sie zudem in serumfreiem Medium mit 1x SR2 analysiert. Betrachtet man die Rezeptorexpression, so ergab sich bei SK-OV-3/icbKD ein der Expression in serumhaltigem Medium entsprechendes Profil, während sich bei MCF-7/icbKD und HEC-1B/icbKD vom Medium abhängige Abweichungen zeigten (s. Abb.18). ER $\alpha$  war bei SK-OV-3 wie in Medium mit 10% FBS durch den Knockdown 2,5fach erhöht ( $p=0,006$ ), während bei MCF-7/icbKD kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen war. HEC-1B zeigte unabhängig vom Knockdown wiederum keine ER $\alpha$ - und PR-Expression. Die ER $\beta$ -Splicevarianten ER $\beta$ 1 ( $p=0,014$ ), ER $\beta$ 2 ( $p<0,001$ ) und ER $\beta$ 5 ( $p<0,001$ ) waren bei SK-OV-3/icbKD auf ca. 50% des Kontrollklons erniedrigt, womit sie bis auf ER $\beta$ 2 die Ergebnisse in Medium mit 10% FBS bestätigten. Bei MCF-7/icbKD war die Expression der ER $\beta$ -Subtypen leicht erhöht, ganz im Gegensatz zur generellen Downregulation der ER $\beta$ -Isoformen in serumhaltigem Medium. ER $\beta$ 1 und 2 waren bei HEC-1B/icbKD in SR2-Medium gegenüber dem Kontrollklon kaum verändert, während die Expression von ER $\beta$ 5 entsprechend den Ergebnissen in DMEM/F12 mit 10% FBS durch den Knockdown um etwa die Hälfte verringert wurde. In Bezug auf PR zeigte sich bei MCF-7 und SK-OV-3 wie in den Versuchen mit 10% FBS eine eindruckliche Expressionssteigerung auf das doppelte (MCF-7/icbKD, n.s.) bzw. 2,5-fache (SK-OV-3/icbKD, n.s.).

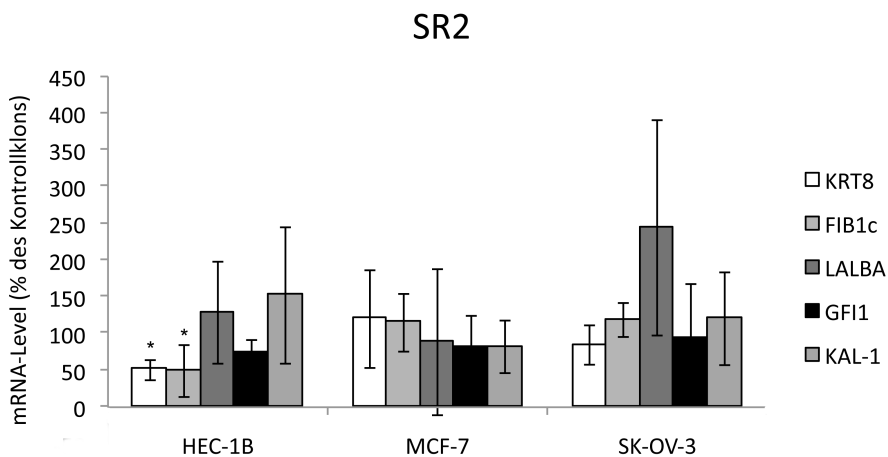
a)



b)



c)



**Abb. 18** Durch den Knockdown von *icb-1* bedingte Änderungen der Genexpression in serumfreiem Kulturmedium (DMEM/F12 + 1x SR2) wie mittels real-time-RT-PCR nachgewiesen. Die Transkript-Level der Hormonrezeptoren (a), Östrogenresponsiven Genen und Zellzyklusregulatoren (b) und Genen, die mit Differenzierung in Verbindung stehen (c) werden in % der Negativkontrollklone dargestellt, die als 100% definiert wurden. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  versus Kontrolle bzw. 100%

Bei den Zellzyklusregulatoren war wiederum eine leichte, jedoch nicht signifikante Downregulation des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF1* auf ca. 65% der Kontrolle bei HEC-1B/*icb*KD (n.s.), 75% bei MCF-7/*icb*KD (n.s.) und zudem ebenfalls 65% bei SK-OV-3/*icb*KD (n.s.) zu beobachten. Die Expression von *Cyclin A2* wurde in 1x SR2 durch den Knockdown bei allen drei Zelllinien kaum beeinflusst. Die deutliche Hochregulation auf ca. das Doppelte der Kontrolle bei HEC-1B/*icb*KD in DMEM/F12 mit 10% FBS war nicht nachvollziehbar. Die *Cyclin D1*-mRNA-Spiegel wurden wie in den Experimenten mit Zusatz von 10% FBS durch den Knockdown nicht tangiert, lediglich bei MCF-7/*icb*KD bestätigte sich die Tendenz zur Downregulation in Abwesenheit von *icb-1* mit Werten von ca. 50% der Negativkontrolle ( $p=0,002$ ). *FOS*, das in 10% FBS durch den Knockdown nicht deutlich verändert exprimiert wurde, war in serumfreiem Medium bei HEC-1B/*icb*KD auf ca. 170% der Kontrolle hoch reguliert ( $p=0,025$ ). Für CDK 2 ergaben sich wiederum keine Veränderungen in Abhängigkeit von der Expression des Gens *icb-1*.

Betrachtet man nun die Differenzierungsmarker, so bestätigt sich bei der Zelllinie SK-OV-3 die zuvor deutliche Hochregulation von *Fibulin 1c* in serumfreiem Medium nicht. Auch die Downregulation von *KRT8* war geringer ausgeprägt und die Verminderung von *KAL-1* nicht nachvollziehbar. Bei MCF-7 konnte die in 10% FBS beobachtete, verminderte Expression von *Fibulin 1c* und *KRT8* in serumfreiem Medium ebenfalls nicht bestätigt werden. In diesem Milieu zeigte sich bei dieser Zelllinie für keinen der Differenzierungsmarker eine deutliche Veränderung durch den Knockdown von *icb-1*. Bei HEC-1B hingegen wiederholte sich die durch den Knockdown bedingte Downregulation von *KRT8* auf etwa die Hälfte der Kontrolle ( $p=0,024$ ). Auch *Fibulin 1c* war wiederum - wenn auch nicht so deutlich wie in serumhaltigem Medium – herunter reguliert ( $p=0,042$ ). Die verminderte Expression von *GFI1* bei HEC-1B/*icb*KD war in 1x SR2 hingegen nicht nachvollziehbar (n.s.).

### 3.4. Einfluss des Knockdowns auf die durch Östradiol stimulierte Genexpression

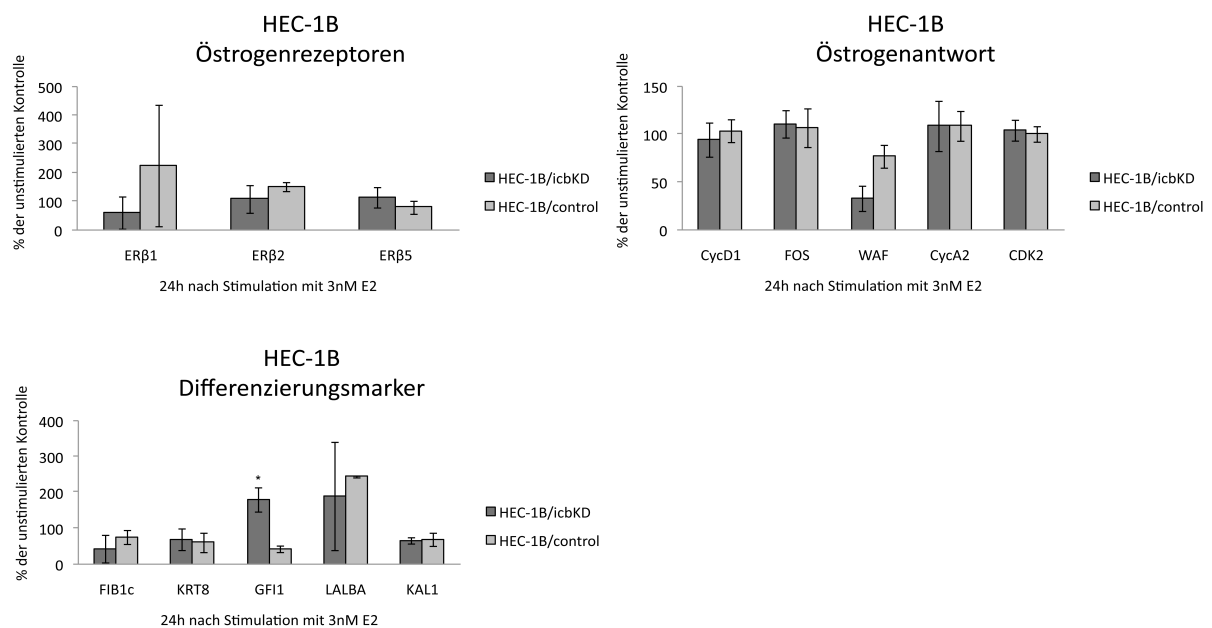
Die Reduktion der *icb-1*-mRNA in den Zellklonen hatte neben der Veränderung des östrogenabhängigen Zellwachstums zu starken Veränderungen der ER-Expression geführt. Somit stellte sich nun die Frage, wie sich der Knockdown auf die durch Östradiol stimulierte Genexpression auswirken würde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in definiertem Medium, das weder Serum noch Phenolrot enthielt, ausgesät und 24 Stunden vor der RNA-Isolation mit 3 nM E2 behandelt. Die Genexpression wurde, wie oben beschrieben, mittels real-time RT-PCR analysiert.

Betrachtet man zunächst die Regulation der Hormonrezeptoren durch Östradiol, so ergab sich bei der östrogenunabhängigen Kontrollzelllinie SK-OV-3 eine leichte Steigerung der ER $\alpha$ -Expression auf ca. 135% des Ausgangswertes ( $p=0,007$ , vs. SK-OV-3/*icb*KD). Die hormonelle Stimulation bewirkte jedoch keine Änderung des ER $\alpha$ -Zielgens PR. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit 3 nM E2 in den SK-OV-3/*icb*KD-Zellen bei etwa gleichbleibendem ER $\alpha$ -Expressionslevel im Zuge der Östrogen vermittelten Genexpression eine leichte Steigerung des mRNA-Levels von PR um ca. 50% (n.s. vs. SK-OV-3-Kontrollklon) zur Folge. In der östrogensensiblen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 führte die Stimulation mit 3nM E2 zu einem leichten Rückgang der ER $\alpha$ -Expression sowohl in der Kontrollzelllinie als auch beim Knockdownklon MCF-7/*icb*KD. Die PR-mRNA war durch den hormonellen Stimulus wie bei den Ovarialkarzinomzellen signifikant auf das ca. Vierfache des unstimulierten Wertes vermehrt (MCF-7/control:  $p=0,002$ , MCF-7/*icb*KD:  $p=0,014$ ), diese Änderung war hier jedoch - unabhängig von der Expression des *icb-1*-Gens - bei beiden Klonen zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte in den HEC-1B-Zellen wiederum keine Expression der Steroidhormonrezeptoren ER $\alpha$  und PR nachgewiesen werden (s. Abb.19).

Hinsichtlich der ER $\beta$ -Isoformen bewirkte die Stimulation mit E2 bei intakter *icb-1*-Expression eine Steigerung der ER $\beta$ 1-mRNA in der HEC-1B Negativkontrolle auf etwa das doppelte des unstimulierten Niveaus. Hier war auch die Expression der Isoform 2 durch den Einfluss des Östrogens signifikant um etwa 50% erhöht. Solche Veränderungen zeigten sich nicht in Bezug auf ER $\beta$ 5 oder in der SK-OV-3 oder MCF-7 Negativkontrolle. Durch den Knockdown von *icb-1* wurde diese Steigerung der Expression des ER $\beta$ 1 bei HEC-1B/*icb*KD verhindert. Hier war eine leicht verminderte Expression von etwa 60% der unstimulierten Kontrolle zu beobachten (n.s. vs. Kontrollklon), ebenso bei SK-OV-3/*icb*KD ( $p=0,018$  vs. Kontrollklon), während bei MCF-7/*icb*KD keine Veränderung detektiert wurde. Die Expression von ER $\beta$ 2 war beim Knockdown-Klon der Mammakarzinomzelllinie jedoch um etwa 50% reduziert (n.s. vs. Kontrollklon). Bei SK-OV-3/*icb*KD war für diesen Subtyp eine leichte Erhöhung der

Expression auf 130% zu beobachten (n.s. vs. Kontrollklon), während sich bei HEC-1B keine Veränderung zeigte. Für die ER $\beta$ -Isoform 5 ergab sich durch den Knockdown von *icb-1* keine deutliche Veränderung der Expression in Reaktion auf E2.

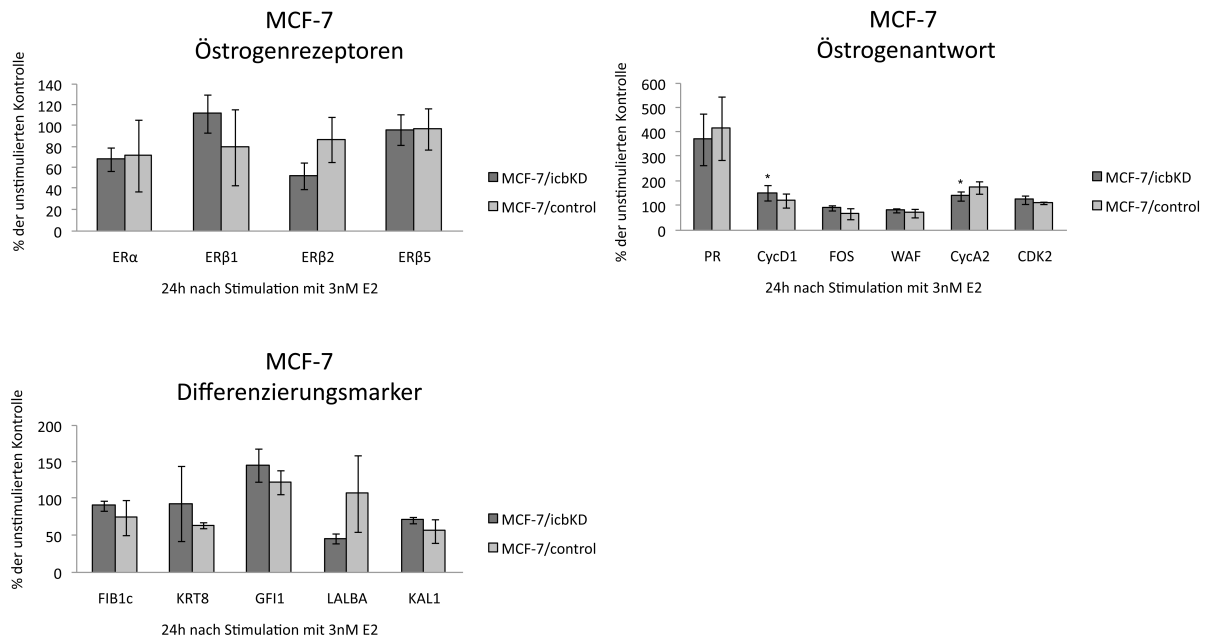
a)



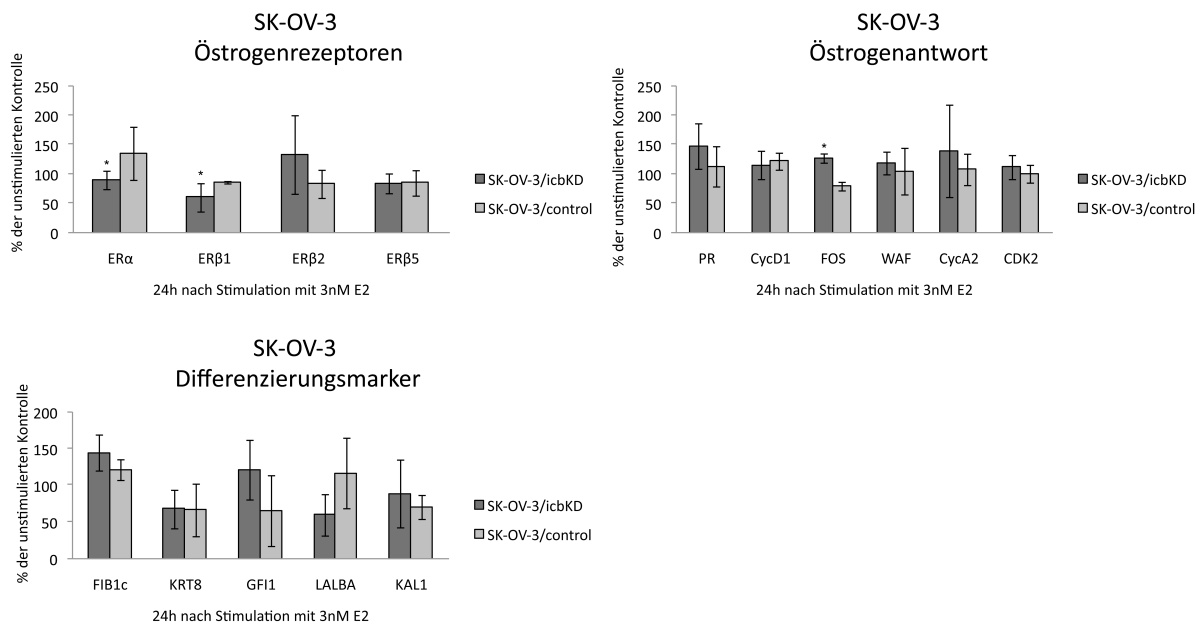
**Abb. 19** Effekt von 17- $\beta$ -Östradiol auf die Genexpression unter Knockdown von *icb-1*. Die HEC-1B- (a), MCF-7- (b) und SK-OV-3-Klone (c) wurden in serum- und phenol-rot-freiem 1x SR2-Medium kultiviert und 18 h vor RNA-Isolation und anschließender real-time-RT-PCR mit 3nM 17- $\beta$ -Östradiol behandelt. Die dargestellten relativen mRNA-Level sind bezogen auf die ethanolhaltige Lösungsmittelkontrolle. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle.



b)



c)



Auch die Expression der Zellzyklusregulatoren veränderte sich durch den Einfluss des Östrogens in allen drei Kontrollzelllinien mit intakter *icb-1*-Expression kaum, lediglich bei der Kontrolle MCF-7 führte die Stimulation zu einer isolierten Erhöhung der mRNA-Spiegel von Cyclin A2 um ca. 70% ( $p=0,0135$  vs. MCF-7/*icbKD*). Infolge des Knockdowns von *icb-1* jedoch reagierten sowohl die Ovarialkrebszellen SK-OV-3/*icbKD* als auch die

Brustkrebszellen MCF-7/*icb*KD auf den Östrogenstimulus verstärkt mit einer Regulation dieser Gene. In beiden Zelllinien kam es zu einer Zunahme der *Cyclin A2*-Transkripte um ca. 40% (MCF-7/*icb*KD:  $p=0,0135$ , SK-OV-3/*icb*KD: n.s. vs. Kontrollklon), bei MCF-7/*icb*KD war außerdem die *Cyclin D1*-mRNA um etwa 50% erhöht ( $p=0,0375$  vs. Kontrollklon,  $p=0,022$  vs. LMK). Diese Effekte waren bei HEC-1B/*icb*KD nicht nachvollziehbar. Bei SK-OV-3/*icb*KD, nicht jedoch bei der Negativkontrolle SK-OV-3 oder einer der anderen Zelllinien, löste die Behandlung mit 3 nM E2 zudem eine signifikante ( $p=0,029$ ) Steigerung der *FOS*-Expression um ca. 30% aus ( $p=0,0312$  vs. Kontrollklon). Für *p21/WAF1* und *CDK2* ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen.

Im Hinblick auf die Expression der Differenzierungsmarker in Reaktion auf Östradiol hatte der *icb-1*-Knockdown keine wesentlichen Auswirkungen. Die Stimulation mit dem Steroidhormon hatte generell nur Einfluss auf die Expression einzelner Differenzierungsgene. Hierbei stellt nur die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B eine Ausnahme dar. Sie reagierte mit einer deutlichen ( $p=0,008$ ) Reduktion der Expression von *Growth Factor Independent 1 (GFI1)* auf ca. 40% und einer signifikanten ( $p=0,008$ ) Steigerung der Expression von *Laktalbumin (LALBA)* auf rund 240% der Werte verglichen mit dem unstimulierten Zustand. Diese Erhöhung der mRNA-Level von *LALBA* konnte auch im Fall des Knockdowns von *icb-1* nachvollzogen werden. In Hinblick auf die Expression von *GFI1* hingegen führte die Stimulation mit E2 bei supprimiertem *icb-1*-Transkript-Level in HEC-1B/*icb*KD zu einer Steigerung der Expression des Gens auf ca. 170% des Ausgangswertes anstatt sie wie beim Kontrollklon zu hemmen. Somit unterschieden sich die Klone hierbei in ihrer Reaktion signifikant ( $p=0,016$ ). Bei den MCF-7/*icb*KD-Zellen war zwar ebenfalls ein Effekt des Östrogens auf die Transkription dieser Gene zu beobachten, dieser war jedoch unabhängig vom *icb-1*-Knockdown: Wie bei HEC-1B/*icb*KD konnte bei beiden Klonen vermehrt *GFI1*-mRNA nachgewiesen werden. Die Expression von *LALBA* hingegen war bei den Mammakarzinomzellen MCF-7/*icb*KD auf 45% der unstimulierten Zellen reduziert, während sich bei der Kontrolle MCF-7 keine Veränderung zeigte. Diese Unterschiede waren statistisch jedoch ebenfalls nicht signifikant. Auch bei SK-OV-3 ergaben sich keine signifikanten Effekte des *icb-1*-Knockdowns auf die östrogenabhängige Expression dieser Gene. Zudem waren bei dieser Zelllinie allgemein nur leichte Veränderungen der Genexpression als Reaktion auf die Hormonstimulation zu beobachten. In Bezug auf die Regulation von *Fibulin 1c*, *KAL-1* und *KRT8* ließ sich ebenfalls bei keiner der Zelllinien ein eindeutiger Einfluss von *icb-1* nachweisen.

### 3.5. Einfluss des Knockdowns von *icb-1* auf die durch Tamoxifen stimulierte Genexpression bei MCF-7

Zur Bestätigung der Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von *icb-1* im Zusammenhang mit 17- $\beta$ -Östradiol, wurden weitere Genexpressionsanalysen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des SERMs 4-OH-Tamoxifen durchgeführt (s. Abb. 20). Diese wurden jedoch auf die Mammakarzinomzellen MCF-7 und MCF-7/*icb*KD beschränkt, da 4-OH-Tamoxifen eine wichtige Rolle in der Therapie von Brustkrebs spielt und auch seine Wirkung auf die Genexpression hier gut erforscht ist, der SERM in der Behandlung von Endometrium- oder Ovarialkrebs jedoch keine Bedeutung hat.

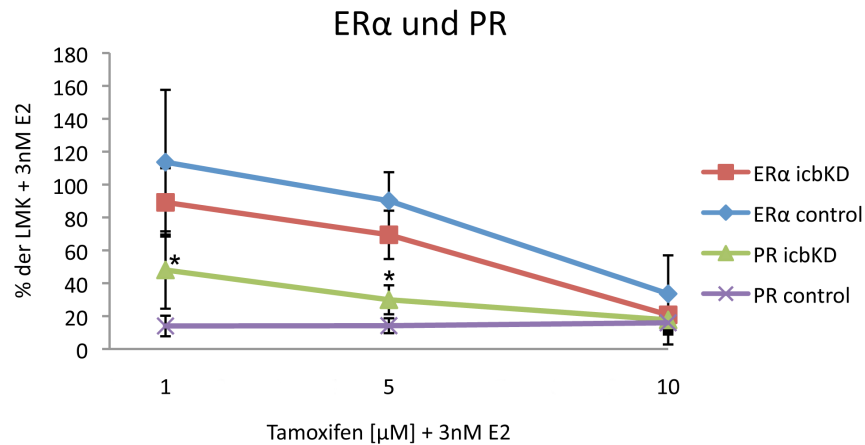
Das im Brustgewebe als Östrogenantagonist agierende 4-OH-Tamoxifen bewirkte in den vorliegenden Versuchen eine deutliche dosisabhängige Reduktion der Expression des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  im Vergleich zum unstimulierten und durch E2 stimulierten Zustand. So wurde die ER $\alpha$ -mRNA durch Stimulation mit 10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 bei MCF-7 auf etwa 30% der Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 reduziert ( $p=0,039$  vs. LMK + E2), bei MCF-7/*icb*KD sogar auf nur 20% ( $p=0,001$  vs. LMK + E2). Dieser geringe Unterschied zwischen den Klonen war jedoch nicht signifikant. Entsprechend dem starken Anstieg der Expression des ER $\alpha$ -Zielgens PR bei Stimulation mit 17- $\beta$ -Östradiol wurde die Expression durch den Antagonisten Tamoxifen gehemmt, wobei der Effekt in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle + 3nM E2 beim Kontrollklon MCF-7 stärker ausgeprägt war. Hier war die Expression auf ca. 15% der LMK + 3nM E2 vermindert ( $p<0,001$  vs. LMK + 3nM E2), während die mRNA-Spiegel bei MCF-7/*icb*KD bei niedrigeren Konzentrationen des SERMs signifikant höher lagen und lediglich bei 10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2 das Niveau der Kontrolle erreichten ( $p<0,001$  vs. LMK + 3 nM E2). Im direkten Vergleich der mRNA-Level der Klone war die PR-Expression bei MCF-7/*icb*KD bezogen auf die MCF-7 Negativkontrollzellen jedoch immer noch auf das zwei- (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) bis fünffache (1  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,004$ , vs. Kontrollklon) erhöht.

Auch der hemmende Effekt des Östradiols auf die Expression von ER $\beta$ 2 bei MCF-7/*icb*KD-Zellen wurde durch die Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen aufgehoben. Es zeigte sich für alle ER $\beta$ -Varianten eine weitgehend von der Expression des Gens *icb-1* unabhängige, dosisabhängige Expressionssteigerung durch den SERM. Bezog man die Daten auf die Lösungsmittelkontrolle + 3nM E2, wobei lediglich der zusätzliche Effekt des SERMs auf die Expression des Rezeptors ermittelt wird, konnte bei der Negativkontrolle eine dosisabhängige Steigerung der Expression von ER $\beta$ 1 auf etwa das zweifache (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) nachvollzogen werden, bei MCF-7/*icb*KD wurde die Expression von ER $\beta$ 1 kaum verändert, womit sich die Klone signifikant ( $p=0,023$ ) unterschieden. Die

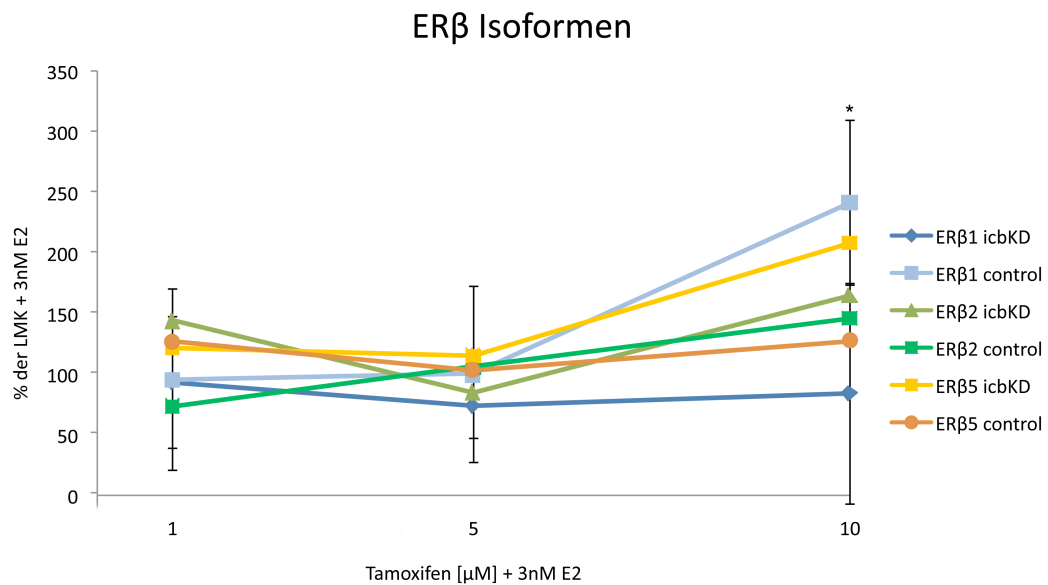
ER $\beta$ 2-mRNA wurde ungeachtet der Expression von *icb-1* durch Stimulation mit 4-OH-Tamoxifen dosisabhängig auf bis zu 150% der Lösungsmittelkontrolle + E2 (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) erhöht. Auch bei ER $\beta$ 5 war eine Steigerung der Expression auf ca. 200% (MCF-7/*icb*KD) bzw. 130% (Kontrolle) zu beobachten, der Unterschied in Abhängigkeit von *icb-1* war jedoch aufgrund hoher Standardabweichungen statistisch nicht signifikant.

Hinsichtlich der Regulation der Zellzykluskontrollgene waren vor Allem die Ergebnisse bei *Cyclin D1*, *Cyclin A2* und *p21/WAF1* bemerkenswert. Bei der Negativkontrolle MCF-7 war für alle Konzentrationen des SERMs die Expression von *Cyclin D1* gegenüber der LMK + 3 nM E2 verringert (1  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,005$  5  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,002$ ). Dieser Effekt zeigte sich beim Knockdownklon nicht, die Expression wurde sogar konzentrationsabhängig auf das maximal 1,5 fache der Lösungsmittelkontrolle + 3nM E2 gesteigert (5  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,037$ ). Bezieht man die Werte auf die unbehandelte Kontrolle, so wird der *icb-1*-abhängige Unterschied noch deutlicher. Bei dem Kontrollklon wurde der leicht steigernde Effekt des Östradiols durch den Antagonisten aufgehoben, so dass gegenüber der unbehandelten Kontrolle keine Änderungen der mRNA-Spiegel von *Cyclin D1* festgestellt werden konnte. Bei MCF-7/*icb*KD hingegen wurde die Expression des Gens durch 4-OH-Tamoxifen zusätzlich zum Östrogeneffekt deutlich gesteigert und erreichte bis zu 300% des unstimulierten Wertes (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) ( $p=0,008$  vs. Kontrollklon). Auch die durch Tamoxifen vermittelte dosisabhängige Herunterregulation von *Cyclin A2* wurde durch den *icb-1*-Knockdown signifikant abgeschwächt (Tamoxifen 1  $\mu$ M:  $p=0,042$ ; Tamoxifen 5  $\mu$ M:  $p=0,0002$ ; Tamoxifen 10  $\mu$ M:  $p=0,034$ , vs. Kontrollklon). Gleichzeitig induzierte der SERM bei beiden Klonen die Expression des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF1*. Für MCF-7/*icb*KD ergab sich eine dosisabhängige bis zu sechsfache Steigerung der Expression von *p21/WAF1* (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2) gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. eine vierfachen Steigerung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle + E2. Bei der Negativkontrolle MCF-7 war dieser Effekt schwächer ausgeprägt, die *p21/WAF1*-Transkripte waren hier lediglich auf das dreifache (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,031$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. auf ca. 160% bezogen auf die LMK + E2 vermehrt. Die Genexpression der anderen Zellzyklusregulatoren wurde durch den SERM nicht wesentlich beeinflusst. Bei *FOS* ließ sich zwar eine leichte Steigerung der Expression durch Tamoxifen gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle + 3 nM E2 beobachten, durch den Knockdown von *icb-1* ergab sich hier allerdings kein Unterschied. Für *CDK2* hingegen war ausschließlich bei MCF-7/*icb*KD eine Steigerung der Expression durch niedrigere Konzentrationen des SERMs zu beobachten, die Werte des Kontrollklons waren gegenüber der LMK + E2 signifikant reduziert (10  $\mu$ M Tamoxifen + 3 nM E2:  $p=0,016$ ). Diese Unterschiede in Abhängigkeit von der Expression von *icb-1* waren allerdings statistisch nicht signifikant.

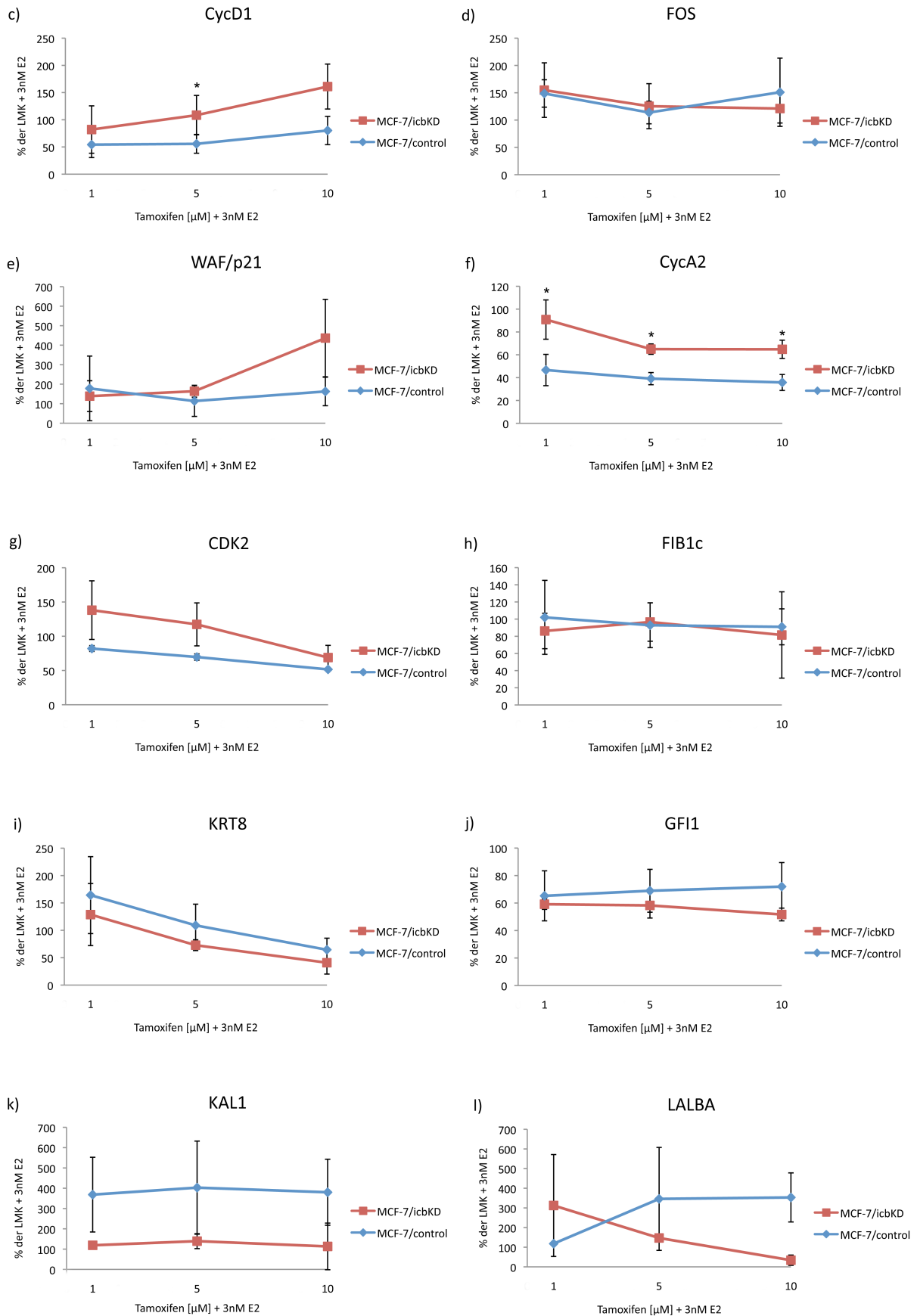
a)



b)



**Abb. 20** Effekt des SERMs 4-OH-Tamoxifen auf die Genexpression unter Knockdown von *icb-1* in östradiolhaltigem Medium. MCF-7-Zellen wurden in serum- und phenolrotfreiem SR2-Medium kultiviert und 24 h vor RNA-Isolation und anschließender real-time-RT-PCR mit einer Kombination von 4-OH-Tamoxifen (1 μM; 5 μM; 10 μM) und 3 nM E2 behandelt. Die Abbildung zeigt a) ERα- und PR-mRNA-Level, b) Expression der ERβ-Isoformen sowie c) bis g) von Zellzyklusgenen und h) bis l) differenzierungsassoziierten Genen. Die dargestellten relativen mRNA-Level sind bezogen auf die ethanolhaltige Lösungsmittelkontrolle mit 3 nM E2. \*p<0,05 versus Kontrolle.



## 4. Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse der Experimente, so zeigt sich neben der bekannten Funktion von *icb-1* bei Differenzierungsprozessen ein deutlicher Einfluss des Gens auch auf die östradiolabhängige Genexpression und Proliferation. Dies spiegelt sich sowohl bei MCF-7 als auch bei SK-OV-3 in der Expression der Steroidhormonrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie östrogenregulierter Gene und bei SK-OV-3 schließlich auch im Wachstumsverhalten wider. Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B fällt hierbei jedoch heraus - wohl aufgrund der nicht nachweisbaren Östrogenrezeptorexpression.

### 4.1. Hintergrund

*Icb-1* wird in einer Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen und Geweben exprimiert und ist an Differenzierungsprozessen beteiligt, so zum Beispiel an der In-Vitro-Differenzierung von Krebszellen durch Wachstum auf einer künstlichen Basalmembran (Treeck *et al.* 1998) oder durch Differenzierung induzierende Substanzen wie 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 oder all-*trans*-Retinsäure (all-transretinoic acid, ATRA) (Treeck *et al.* 2002). Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Expression des Gens *icb-1* ER $\alpha$ -abhängig durch Östrogen stimuliert werden kann (Bollmann *et al.* 2008) und da Östrogene bekanntlich das Wachstum hormonsensitiver Zellen fördern, sollte in dieser Arbeit die Rolle von *icb-1* in der Proliferationskontrolle von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen durch das Steroidhormon untersucht werden.

Proliferation und Differenzierung als grundlegende Zellfunktionen stellen das Ergebnis komplexer Genexpressionsmuster dar, die durch spezifische Signale aktiviert werden. Diese beiden Funktionen sind zumindest teilweise als gegensätzlich anzusehen, da Differenzierungsprozesse oft mit Zellzyklusarrest verbunden sind (Borrellini & Oka 1989). Angesichts der Tatsache, dass die Stimulation der zellulären Differenzierung mit einer signifikanten Steigerung der Expression von *icb-1* verbunden ist (Treeck *et al.* 1998 und 2002) und auch Östrogene, die in hormonresponsiven Geweben für die Proliferationssteigerung verantwortlich sind, seine Expression induzieren, wurde ein möglicher Einfluss von *icb-1* auch auf die östrogenabhängige Proliferation vermutet. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden drei Krebszelllinien als Zellkulturmodell verwendet: Zunächst die hormonsensitive, ER $\alpha$ -positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Brooks *et al.* 1973, Dickson *et al.* 1986) und weiterhin die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3, die weder sensitiv für Östrogene noch für Antiöstrogene ist, *HER2/neu* überexprimiert und

als eher aggressiver, schnell wachsender Zelltyp bekannt ist (Hua *et al.* 1995, Lau *et al.* 1999). Beide Zelllinien exprimieren *icb-1* in ähnlichem Ausmaß (Bollmann *et al.* 2008). Schließlich wurde die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B ausgewählt, die zwar in der Literatur als positiv sowohl für ER $\alpha$  als auch für ER $\beta$  sowie als östrogen- und tamoxifenresponsiv beschrieben wird (Assikis & Jordan 1995), bei der jedoch in den vorliegenden Experimenten kein ER $\alpha$  sowie kein PR nachweisbar war und die keine Östrogenantwort zeigte. Auch Gong *et al.* beschrieben diese Zelllinie in ihren Experimenten als negativ für Östrogenrezeptoren (Gong *et al.* 1994).

#### **4.2. Bestätigung der Rolle von *icb-1* bei Differenzierungsprozessen**

In dieser Arbeit konnte zunächst die Relevanz von *icb-1* für die Differenzierung von Tumorzellen bestätigt werden. In SK-OV-3-Zellen führte der Knockdown von *icb-1* zu einer Downregulation von *KRT8*, einem Zytokeratin, das in Ovarialepithel in hohem Maße exprimiert wird und generell als Epithelzellmarker gilt (Gava *et al.* 2008). Dieser Effekt war sogar noch stärker bei verminderter *icb-1*-Expression in der Zelllinie HEC-1B/*icb*KD zu beobachten. Bei MCF-7/*icb*KD war ebenfalls eine leichte, jedoch signifikante Verringerung der Expression feststellbar. Die Reduktion der *KRT8*-Transkript-Level kann als starker Hinweis auf einen Verlust von Differenzierungsmerkmalen durch den Knockdown von *icb-1* gewertet werden und unterstützt somit die vermutete Rolle dieses Gens in der zellulären Differenzierung. Ein Verlust des Epithelzellmarkers *KRT8* wurde in verschiedenen Krebsentitäten, darunter auch Brustkrebs, beschrieben und scheint mit kurzem Überleben beziehungsweise aggressivem Wachstum und hoher Rekurrenz zu korrelieren (Fuchs *et al.* 2002, Iwaya *et al.* 2003, Walker *et al.* 2007, Abdel-Fatah *et al.* 2008, Bonin *et al.* 2008). Jedoch wird in einzelnen Studien ein gegensätzlicher Effekt postuliert und eine Überexpression von *KRT8* in epithelialen Tumoren beschrieben (Casanova *et al.* 2004). Neben der Downregulation von *KRT8* führte der Knockdown von *icb-1* zu einem erhöhten Transkriptlevel von *Fibulin 1c* bei SK-OV-3, wohingegen dies bei MCF-7 und insbesondere bei HEC-1B nicht der Fall war. Der Knockdown der Endometriumkarzinomzelllinie zeigte sogar eine deutlich reduzierte Expression des Gens. *Fibulin 1c* kodiert für ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, das von Ovarialkrebszellen sezerniert wird (Clinton *et al.* 1996). Es kann durch Östrogene in Abhängigkeit von ER $\alpha$  induziert werden (Moll *et al.* 2002, Cunat *et al.* 2004). Auch in den vorliegenden Experimenten wurde die Expression dieses Gens durch Östrogene stimuliert, wobei die Reaktion im SK-OV-3-Knockdownklon stärker ausgeprägt war. Deshalb sind die erhöhten *Fibulin 1c*-Spiegel in SK-OV-3/*icb*KD-Zellen vermutlich als Folge des verstärkten Ansprechens auf Östrogene zu werten. Da eine Überexpression von *Fibulin 1c* während der ovariellen Karzinogenese häufig auftritt und mit



Differenzierungsverlust assoziiert ist (Cunat *et al.* 2004, Gallagher *et al.* 2005), unterstützt die beobachtete Hochregulation von *Fibulin 1c* infolge des Knockdowns von *icb-1* die Bedeutung des Genes für den Erhalt eines differenzierten Zellzustandes. Auch beim Mammakarzinom ist eine Überexpression von *Fibulin 1* zu beobachten (Greene *et al.* 2003; Gallagher *et al.* 2005), zudem wird es bei entsprechenden Zelllinien wie MCF-7 exprimiert (Forti *et al.* 2002). Allerdings scheint es hier auch immunogen zu wirken und in Kombination mit lymphozytärer Infiltration im Tumorgebiet mit einer günstigeren Prognose verbunden zu sein (Forti *et al.* 2002, Puna *et al.* 2004). Im Endometrium hingegen wird *Fibulin 1* im Verlauf des Menstruationszyklus örtlich und zeitlich spezifisch reguliert und im Drüsengewebe während der Proliferationsphase induziert, während die Expression im Stroma im Verlauf der Sekretionsphase durch Progesteron gesteigert wird (Nakamoto *et al.* 2005). *Fibulin 1* scheint so eine wichtige Rolle beim geordneten Ablauf des Zyklus und der Vorbereitung der Nidation sowie der Angiogenese zu spielen (Allan *et al.* 2003, Haendler *et al.* 2004, Nakamoto *et al.* 2005). Somit könnte die durch den *icb-1*-Knockdown verminderte Expression des Extrazelluläre-Matrix-Proteins im Falle der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B auf einen Verlust dieser regelrechten Eigenschaften hinweisen.

Bei weiteren Genen, die in Zusammenhang mit Differenzierung gebracht wurden, so beispielsweise bei *GFI1* und *LALBA*, war ein isolierter Effekt des *icb-1*-Knockdowns bei der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B zu beobachten. Hier führte die verringerte Expression des *icb-1*-Gens zur Herunterregulierung beider Gene. Dies war besonders deutlich bei *GFI1* zu beobachten. Das Gen *GFI1* (*Growth factor independence-1*) kodiert für ein nukleäres Zinkfinger-Protein, das als Transkriptionsfaktor fungiert (van der Meer *et al.* 2010). Ihm wird eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung von Immunzellen sowie beim Reifungsprozess von Erythrozyten und Megakaryozyten (Saleque *et al.* 2002) und der Entwicklung der Sinneszellen im Innenohr zugeschrieben (Möröy *et al.* 2004). Weiterhin hemmt *GFI1* die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (van der Meer *et al.* 2010). Andererseits jedoch wird dieses Gen vor Allem bei hämatologischen Neoplasien wie beispielsweise Lymphomen als Proto-Onkogen (Grimes *et al.* 1996a, Schmidt *et al.* 1998, Kazanijan *et al.* 2004) beschrieben, das als Transkriptionsrepressor den G1-Arrest hemmt (Grimes *et al.* 1996a und b, Zweidler McKay *et al.* 1996) und über die Inhibition proapoptotischer Faktoren wie *Bax* den Zelltod verhindert (Grimes *et al.* 1996 a und b). In diesem Zusammenhang interagiert es zudem mit anderen Onkogenen wie *PIM* und *MYC* (van der Meer *et al.* 2010). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) wiederum ist *GFI1* an der neuroendokrinen Differenzierung beteiligt und scheint die Tumorförderung möglicherweise durch Erhalt dieses für die Autostimulation notwendigen Phänotyps zu begünstigen (Kazanijan *et al.* 2004). Bei nicht neuroendokrinem, nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) hat *GFI1* einen gegensätzlichen Effekt. Hieran wird deutlich,

dass *GF11* zelltypspezifisch, auch in Abhängigkeit von der Interaktion mit weiteren Proteinen, unterschiedliche Funktionen ausübt. Es kann einerseits als Onkogen fungieren, wie bei SCLC und Lymphomen der Fall, andererseits jedoch die Proliferation beispielsweise bei hämatopoetischen Stammzellen und NSCLC hemmen (Kazanjan *et al.* 2006). Die Downregulation von *GF11* im Kontext des Endometriumskarzinoms und im Speziellen von HEC-1B kann aufgrund fehlender konkreter Studien zur Rolle des Gens in diesem Gewebetyp somit nicht eindeutig abschließend bewertet werden.

*LALBA* wiederum kodiert für das in der Muttermilch sezernierte Protein  $\alpha$ -Lactalbumin, das in seiner Faltvariante HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells) auf bestimmte Zelltypen eine proapoptotische Wirkung ausübt (Hakansson *et al.* 1995, Svensson *et al.* 2000). Zu diesen zählen vor allem undifferenzierte embryonale oder transformierte Zellen sowie bestimmte Immunzellen, wohingegen reife Zellen unbeeinflusst bleiben. Auch scheint das Protein  $\alpha$ -Lactalbumin, beziehungsweise seine Faltvariante HAMLET, bei der Involution der Mammæ durch die Förderung apoptotischer Vorgänge eine Rolle zu spielen (Baltzer *et al.* 2004, Sharp *et al.* 2008). Somit deutet die Herunterregulation dieses Gens bei *icb*/KD-Zellen ebenfalls auf einen Differenzierungsverlust hin. Zusammenfassend finden sich somit in den vorliegenden Experimenten weitere Hinweise, die eine Rolle des Gens *icb-1* bei Differenzierungsprozessen bestätigen.

### **4.3. Bedeutung von *icb-1* im Kontext zellulärer Proliferation und Östrogenresponse**

#### **4.3.1.SK-OV-3**

Neben den Effekten auf differenzierungsassoziierte Gene zeigte der Knockdown von *icb-1* zudem deutliche Auswirkungen auf das zelluläre Proliferationsverhalten und die Östrogenantwort. Besonders bemerkenswert waren die Ergebnisse bei der östrogenresistenten Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 (Hua *et al.* 1995; Lau *et al.* 1999). Bei dieser steigerte der Knockdown von *icb-1* das Zellwachstum in standardisiertem, serumfreiem Medium mit SR2 deutlich. Er ermöglichte weiterhin eine starke proliferative Antwort auf das Steroidhormon 17- $\beta$ -Östradiol, was angesichts der beschriebenen Östrogenresistenz der Zelllinie noch erstaunlicher war. Die entsprechenden Daten aus den Genexpressionsanalysen bieten eindeutig eine Erklärungsmöglichkeit für die veränderten Wachstumseigenschaften dieser Zelllinie infolge des Knockdowns von *icb-1*. Die SK-OV-3/*icb*KD-Zellen zeigten eine beachtliche Steigerung der Expression von ER $\alpha$ , ein Effekt, der aufgrund der gleichzeitigen Hochregulation E2-kontrollierter Gene wie *PGR*, *Cyclin D1* oder *Fibulin 1c* als biologisch relevant anzusehen ist. Es ist bekannt, dass ER $\alpha$  in der Lage ist, als

Reaktion auf das Hormon Östrogen die zelluläre Proliferation zu stimulieren. Einerseits geschieht dies durch verstärkte Expression von Genen wie *Cyclin D1* oder von Wachstumsfaktoren, die mit der Zellzyklusprogression in Verbindung stehen, andererseits durch die Downregulation antiproliferativer und proapoptotischer Gene (Sabbah *et al.* 1999; Frasor *et al.* 2003). Daher ist die Hochregulation dieses Rezeptors eine plausible Erklärung für die verstärkte, durch Östradiol ausgelöste Proliferation des Knockdown-Klons.

Im Gegensatz zu dem Effekt auf ER $\alpha$  war die Expression der ER $\beta$ -Isoformen ER $\beta$ 1 und ER $\beta$ 2 und ER $\beta$ 5 in serumhaltigem und serumfreiem Kulturmedium bei SK-OV-3 Zellen mit *icb-1*-Knockdown vermindert. Die Downregulation dieses ER-Subtyps ist ein weiterer möglicher Faktor, der die Proliferation der icbKD-Zellen fördern kann, da ER $\beta$  in verschiedener Hinsicht als Gegenspieler von ER $\alpha$  und zudem als Tumorsuppressor mit antiproliferativen Eigenschaften beschrieben wird (Lazennec *et al.* 2001, Bardin *et al.* 2004, Cheng *et al.* 2004, Treeck *et al.* 2007). Weiterhin wird der Verlust dieses Rezeptorsubtypes mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht und verschiedene Studien belegen, dass die verminderte Expression von ER $\beta$  eine Proliferationssteigerung bei Ovarialkarzinomzellen bedingt (Pujol *et al.* 1998; Treeck *et al.* 2007). Daher kann die Down-Regulation dieses Rezeptors als zweiter wichtiger Mechanismus des beschleunigten Zellwachstums gesehen werden.

Die verstärkte Östrogenantwort bei SK-OV-3/icbKD im Sinne einer Proliferationssteigerung durch veränderte Expression der Östrogenrezeptoren ist somit als Ergebnis einer neu erlangten Genregulation durch Östradiol zu sehen. Der durch das Steroidhormon ausgelöste Anstieg der PR-Expression weist deutlich auf eine verstärkte Aktivität von ER $\alpha$  hin. Dementsprechend scheint ER $\alpha$  der Hauptauslöser der Proliferationsantwort zu sein, die bei SK-OV-3/icbKD zumindest teilweise durch eine östadiolvermittelte Hochregulation von *FOS* bedingt ist. Dieses als Protoonkogen bekannte Zielgen der zellulären Östrogenwirkung führt über die Regulation weiterer Zellzykluskontrollgene zur Zellzyklusprogression (Krauss 2003, S.485; Peng & Jordan 2008, S.196). Die Rolle von ER $\alpha$  als bedeutendstem Faktor konnte weiterhin durch Experimente mit dem spezifischen ER $\alpha$ -Agonisten PPT bestätigt werden, der eine 410-fache Bindungsaffinität für ER $\alpha$  gegenüber ER $\beta$  besitzt (Stauffer *et al.* 2000). Die Behandlung mit dieser Substanz führte zu einem stark beschleunigten Wachstum der SK-OV-3/icb-KD-Zellen. Die Proliferation war sogar stärker ausgeprägt als bei der Stimulation mit E2 selbst, was klar auf einen ER $\alpha$ -abhängigen Mechanismus hindeutet. Jedoch erhöhte auch ER $\beta$ -Agonist DPN die Proliferationsrate dieser Zelllinie, obwohl der Rezeptor in Zusammenhang mit der Vermittlung antiproliferativer Effekte bei Mamma- und Ovarialkarzinomzellen gebracht wird und zudem wie oben beschrieben bei SK-OV-3/icbKD herunter reguliert war. Bedenkt man, dass niedrige Konzentrationen von DPN (1 nM) das Wachstum des Klons nicht signifikant erhöhten, kann dieser Effekt möglicherweise durch die

nur eingeschränkte Selektivität der Substanz DPN für ER $\beta$  erklärt werden. Die Selektivität bzw. Bindungsaffinität für ER $\beta$  beträgt zwar das 70-Fache derer für ER $\alpha$  (Meyers *et al.* 2001), bei höheren Konzentrationen könnte jedoch eine zusätzliche Aktivierung von ER $\alpha$  zu der beobachteten Proliferation geführt haben (Harrington *et al.* 2003, Escande *et al.* 2006).

Um die Bedeutung von *icb-1* im Rahmen der durch Östradiol getriggerten Proliferation weiter zu untersuchen, wurden die Klone zusätzlich mit 4-OH-Tamoxifen, dem aktiven Metaboliten des Selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulators (SERM) Tamoxifen (Clemons *et al.* 2002) und mit dem reinen Antiöstrogen ICI 182,780 behandelt (Dauvois *et al.* 1993). Beide Substanzen, 4-OH-Tamoxifen und in ähnlichem Maße ICI 182,780 hemmten in den vorliegenden Versuchen das Östradiol-vermittelte Zellwachstum der SK-OV-3/*icb*-KD-Zellen deutlich, was wiederum die Abhängigkeit der Proliferation von ER $\alpha$  bestätigt und die neu erlangte Östrogensensibilität von SK-OV-3/*icb*KD belegt. In dieser Hinsicht unterschieden sich die Knockdownzellen signifikant von der Negativkontrolle SK-OV-3, die auf ICI 182,780 kaum beziehungsweise mit einem leicht stärkerem Wachstum reagierte. Bei Tamoxifen sprach sie nur auf höhere Konzentrationen des SERMs an - wohl aufgrund zytotoxischer Effekte und Auslösung von Apoptose. Bei niedrigen Konzentrationen ließ sich ebenfalls eine leichte Proliferationssteigerung beobachten. Anders als die antiproliferative, unspezifische Wirkung der Antiöstrogene bei höheren Konzentrationen legt diese Wachstumssteigerung durch niedrigere Dosen von ICI 182, 780 oder 4-OH-Tamoxifen eine gewisse - möglicherweise rezeptorunabhängige - Zellantwort auch bei den Negativkontrollzellen nahe. Diese war jedoch weniger deutlich ausgeprägt und steht im Gegensatz zu den im Allgemeinen beschriebenen proliferationshemmenden Eigenschaften dieser Substanzen (Cicatiello *et al.* 2000; Clemons *et al.* 2002), wenngleich zumindest für den SERM 4-OH-Tamoxifen in geringen Dosen bei Ovarialkarzinomzelllinien auch leichte Wachstumssteigerungen beschrieben werden (Galtier-Dereure *et al.* 1992). Eine Umkehr der Wirkung von Östrogenantagonisten zu Agonisten andererseits kann beispielsweise, wie in verschiedenen Publikationen beschrieben, durch Punktmutationen im *ESR1*-Gen hervorgerufen werden (Mahfoudi *et al.* 1995, Montano *et al.* 1996). Der ER der Zelllinie SK-OV-3 weist nun zwar tatsächlich zumindest eine Deletion auf, jedoch sind entsprechende Effekte bisher nicht beobachtet worden (Hua *et al.* 1995; Lau *et al.* 1998).

Sucht man dann nach Erklärungsmodellen für die durch den Knockdown von *icb-1* ausgelösten starken Diskrepanzen in der Wirkung des SERMs 4-OH-Tamoxifen mit dem deutlich antiproliferativen Effekt beim Knockdownklon und im Kontrast dazu geringer Wirkung beim Kontrollklon, so kommt einerseits eine vermehrte Induktion von Apoptose oder aber eine verstärkte Proliferationshemmung in Betracht. Eine gesteigerte Auslösung von Apoptose durch den Knockdown von *icb-1* lässt sich anhand der Ergebnisse der Experimente nicht bestätigen, da hier nur die höchsten Konzentrationen eine

apoptoseinduzierende Wirkung besaßen und kein Unterschied in Anhängigkeit der Expression von *icb-1* festgestellt werden konnte. Die starke Diskrepanz im Wachstum muss somit auf eine durch Knockdown von *icb-1* ermöglichte ER-abhängige Proliferationshemmung durch die Antiöstrogene zurückzuführen sein. Sie ergibt sich hier wiederum aus der starken proliferativen Östrogenantwort der Knockdownzellen: Da diese durch den E2-Stimulus einen deutlichen Wachstumsvorteil hatten, führte die Antagonisierung dieses Effekts durch die Antiöstrogene zu einem deutlichen Wachstumsrückgang, was wiederum die Östrogensensibilität des Wachstumsverhaltens des Klons bestätigt. Die Kontrollzellen hingegen wurden durch das Steroidhormon kaum beeinflusst. So konnte eine Hemmung dieser hormonellen Wirkung ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf das Zellwachstum ausüben.

Diese Ergebnisse zur neu erlangten Östrogenantwort des SK-OV-3-Knockdownklons sind insbesondere auch deshalb interessant, weil das Ovarialkarzinom generell nicht stark auf eine Behandlung mit Antiöstrogenen anspricht (Hatch *et al.* 1991). Zudem wurde - wie zuvor erwähnt - bisher beschrieben, dass der Östrogenrezeptor der SK-OV-3-Zellen nicht funktionsfähig sei, da das *ESR1*- Gen dieser Zelllinie eine Deletion in Exon 1 enthält. Es soll jedoch für ein zumindest partiell funktionales ER $\alpha$ -Protein codieren. Dieser mutierte Rezeptor bindet sowohl E2 als auch Östrogen-Response-Elemente (EREs), wodurch er Östrogeneffekte auf early-response-Gene, also Gene der frühen Zellantwort wie *FOS* vermitteln kann, jedoch die Expression von PR oder die Proliferation nicht beeinflusst (Hua *et al.* 1995; Lau *et al.* 1998). Die beobachtete zelluläre Östrogenantwort, die durch den Knockdown von *icb-1* erreicht wurde, stellt somit einen eindeutigen Funktionsgewinn der ER-Wirkung dieses Zellklons dar. Fasst man die Ergebnisse sowohl der Zellkultur als auch der molekulargenetischen Analysen zusammen, so deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass die beobachtete Hochregulation von ER $\alpha$  und die Hemmung der Expression von ER $\beta$  zumindest zwei mögliche Erklärungsmodelle für den offensichtlichen Funktionszugewinn des ER $\alpha$  dieser Zelllinie hinsichtlich Proliferation und Genexpression darstellen. Aufgrund von Analysen der Expression der ER $\alpha$ -Splice-Varianten in unserer Arbeitsgruppe lässt sich ein verändertes Expressionsprofil der Varianten als Ursache für die verstärkte Östrogenantwort ausschließen (Unveröffentlichte Daten, Treeck).

#### **4.3.2. MCF-7**

Im Gegensatz zu den bemerkenswerten Ergebnissen bei SK-OV-3 beeinflusste der Knockdown von *icb-1* bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 das Zellwachstum weniger deutlich. In Standardkulturmedium mit 10% FBS zeigte sich keine Veränderung der Proliferation in Bezug auf die Negativkontrolle, in standardisiertem Medium mit 1x SR2 war die Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen des Knockdownklons sogar geringer als bei der

Negativkontrolle. Zwar ergaben sich in zeitabhängigen Proliferationsexperimenten mit Östradiol Hinweise auf ein verstärktes Ansprechen des Knockdownklons auf das Steroidhormon, bei Dosis-Wirkungs-Analysen, sowie bei Versuchen mit den selektiven Östrogenrezeptoragonisten PPT und DPN konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden. Es zeigte sich lediglich ein allgemein starkes Ansprechen der Zelllinie auf den hormonellen Stimulus, unabhängig von der *icb-1*-Expression. Damit in Einklang stehen die Ergebnisse der Proliferationsversuche mit dem Östrogenantagonisten ICI 182,780 und dem SERM 4-OH-Tamoxifen, die wie bei dieser Zelllinie wiederholt vorbeschrieben (Katzenellenbogen *et al.* 1987, Howell *et al.* 2000) zu einer deutlichen Proliferationshemmung allerdings ohne signifikante Steigerung der Apoptose führten. Hierbei war jedoch ebenfalls kein Einfluss von *icb-1* bemerkbar. Im Gegensatz dazu konnte auf Ebene der Genexpression des MCF-7-Knockdownklons durch die Messung erhöhter ER $\alpha$ - und PR-mRNA-Spiegel einerseits und die verminderte Expression von ER $\beta$  andererseits nachgewiesen werden, dass *icb-1* auch bei Brustkrebszellen die Expression der Steroidrezeptoren beeinflusst. Abweichend von diesen eindeutigen Ergebnissen in serumhaltigem Medium war unter serumfreien Bedingungen lediglich eine leichte, jedoch nicht signifikante Hochregulation des Progesteronrezeptors zu beobachten, während die ER $\alpha$ -Expression nicht signifikant verändert war und die ER $\beta$ -Varianten 1 und 2 sogar etwas stärker exprimiert wurden als beim Kontrollklon. Dies bietet eine mögliche Erklärung für das verminderte Zellwachstum in 1x SR2, da der positive Einfluss der Hochregulation von ER $\alpha$  fehlte und die erhöhten ER $\beta$ -Isoformen im Gegensatz dazu mit Proliferationshemmung in Verbindung gebracht werden (Speirs & Shaaban 2009). Die Unterschiede im Expressionsverhalten in den unterschiedlichen Medien sind wohl auf unspezifische Stimuli der Serumkomponenten, die teilweise auch östrogenartig wirken sollen (Ruedl *et al.* 1990), zurückzuführen.

Neben der veränderten Expression der Hormonrezeptoren verstärkte der *icb-1*-Knockdown trotz mangelnder Auswirkung auf die tatsächliche Proliferation die Responsivität der Mammarkarzinomzelllinie für Östrogene, was sich an der verstärkten Aktivierung der Expression von *Cyclin D1* nachvollziehen lässt (Sabbah *et al.* 1999; Lewis *et al.* 2005). *Cyclin D1* als wichtiges Zielgen für Östrogen spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der zellulären Proliferation, jedoch auch bei der Dysregulation des Zellzyklus im Rahmen der Tumorentstehung (D'Andrilli *et al.* 2007, S.6; Peng & Jordan 2008, S.198). Trotz Allem war die Hochregulierung von ER $\alpha$  und die Herunterregulierung von ER $\beta$  nicht ausreichend um den E2-Effekt auf die Expression von PR zu verstärken. Auch die veränderte Expression von *Cyclin D1* als Reaktion auf E2 oder die Down-Regulierung von *p21/WAF1* in serumhaltigem Medium führte nur zu einer geringen Steigerung der zellulären Proliferation. Dies kann durch die bei Wildtyp-MCF-7-Zellen generell bereits starke Expression eines funktionsfähigen ER $\alpha$

zu erklären sein, die eine deutliche Östrogen-Responsivität dieser Zelllinie hinsichtlich des Wachstums und der Expression von PR bedingt (Brooks *et al.* 1973, Villalobos *et al.* 1995). Die durch den Knockdown von *icb-1* auf mRNA-Ebene noch etwas stärker ausgeprägte Sensibilität für Östrogene hatte demzufolge vermutlich einen vergleichsweise zu geringen Einfluss, um die Indikatoren der zellulären Östrogenwirkung merkbar weiter zu verstärken. Somit ist auch nachvollziehbar, dass die Behandlung mit den Antagonisten 4-OH-Tamoxifen und ICI 182,780 das Wachstum der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie MCF-7 dosisabhängig hemmte, sich jedoch ebenso wenig wie bei der Behandlung mit Östrogenen ein Unterschied hinsichtlich der *icb-1*-Expression feststellen ließ.

Auf mRNA-Ebene manifestierte sich die durch 4-OH-Tamoxifen vermittelte Hemmung der Östrogenantwort in einer Herunterregulation von ER $\alpha$  und PR, wobei die Auswirkungen auf PR durch den Knockdown von *icb-1* abgeschwächt wurden. Während bei dem Kontrollklon MCF-7 auch östrogenresponsive Gene wie *Cyclin D1* und *Cyclin A2* durch den SERM deutlich herunter reguliert wurden, war dieser Effekt infolge des Knockdowns von *icb-1* weniger deutlich ausgeprägt, bei *Cyclin D1* war durch den Knockdown sogar eine Expressionssteigerung zu beobachten. Da Cycline in ihrer Rolle als positive Zellzyklusregulatoren die Zellteilung und somit die Proliferation fördern, und gerade *Cyclin D1* in Tumoren häufig verstärkt aktiv ist und so den Zellzyklus am Übergang G0 zu G1 vorantreibt (Krauss 2003, S. 485; D'Andrilli *et al.* 2007), würden diese Unterschiede ein durch den Knockdown von *icb-1* bedingtes vermindertes Ansprechen auf Tamoxifen vermuten lassen, was in den vorliegenden Experimenten jedoch nicht der Fall war. Gleichzeitig mit der relativ höheren Expression dieser proliferationsfördernden Gene wurde allerdings auch die Expression des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF1* durch Tamoxifen bei beiden Klonen erhöht; hier überwog jedoch die Wirkung auf den Knockdownklon. Durch die Aktivierung von *p21/WAF1* als CDK-Inhibitor, der so einen Zellzyklusarrest bewirken kann (Krauss 2003, S.498), wäre wiederum eine stärkere Proliferationshemmung beim Knockdownklon zu erwarten, die allerdings ebenfalls nicht beobachtet werden konnte. Diese simultan relativ erhöhten mRNA-Spiegel von positiven wie ebenso negativen Regulatoren des Zellzyklus können sich in ihrer Wirkung gegenseitig aufgehoben haben und machen somit plausibel, dass die einzelnen molekularen Veränderungen keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten des Knockdownklones hatten.

#### **4.3.3. HEC-1B**

Den geringsten Effekt hinsichtlich einer Auswirkung des *icb-1*-Knockdowns in Bezug auf die zelluläre Proliferation zeigte die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B. Weder unter Standardkulturbedingungen noch durch Stimulation mit Östradiol ließ sich ein Wachstumsvorsprung des *icb-1*-Knockdownklons feststellen. Hierbei muss besonders betont

werden, dass ungeachtet der *icb-1*-Expression durch den Stimulus des Steroidhormons keinerlei Wachstumssteigerung im Vergleich zum unstimulierten Zustand erfolgte. Dies ist wenig überraschend, bedenkt man die hier nachgewiesene, offenbar fehlende Expression von ER $\alpha$ , des wichtigsten Mediators der östradiolgetriggerten Proliferation, sowie eines wichtigen Zielgenes, des PR. In Einklang hiermit steht zudem die fehlende Reaktion der Zelllinie auf den selektiven ER $\alpha$ -Agonisten PPT. Auch infolge der Behandlung mit dem ER $\beta$ -Agonisten DPN zeigten die Zellen unabhängig von der Expression von *icb-1* keine veränderte Proliferation, wenngleich ER $\beta$ -Subtypen von beiden Klonen exprimiert wurden. Entsprechend der fehlenden zellulären Antwort von HEC-1B auf Östrogene fiel auch die Reaktion auf den Östrogenantagonisten ICI 182,780 und den SERM 4-OH-Tamoxifen vergleichsweise gering aus, was den östrogenunabhängigen Phänotyp der Zelllinie untermauert. In höheren Konzentrationen ließ sich bei 4-OH-Tamoxifen zwar ein östrogenunabhängiger proliferationshemmender Effekt nachweisen, dieser ist jedoch durch die zytotoxische Wirkung der Substanz zu erklären. Der SERM hatte in höheren Konzentrationen eine apoptoseinduzierende Wirkung auf beide Klone, wobei der Effekt durch den Knockdown von *icb-1* bei hohen Konzentrationen signifikant reduziert war, was auf eine Bedeutung von *icb-1* in der Vermittlung der proapoptotischen Wirkung von Tamoxifen bei dieser Zelllinie hindeutet. Bei höheren Dosen von ICI 182,780 hingegen zeigte sich - wiederum unabhängig von der Anwesenheit von Östradiol - ein proliferationssteigernder Effekt. Beide Tendenzen wurden jedoch nicht von der Expression von *icb-1* beeinflusst. Die Wachstumssteigerung in Reaktion auf den reinen Östrogenantagonisten ICI 182,780 im Gegensatz zur Wachstumshemmung bei Tamoxifen ist erstaunlich, da in der Literatur dem SERM, nicht jedoch dem Östrogenantagonisten eine proliferationsfördernde Wirkung am Endometrium zugeschrieben wird (Howell *et al.* 2000). Einzelne Publikationen scheinen dem allerdings zu widersprechen. So zeigte ICI 182,780 in einer Publikation mit HEC-1A Eigenschaften eines partiellen ER-Agonisten in Bezug auf ein E2-responsives Plasmid, dies wurde jedoch nicht durch entsprechende Proliferationsstimulation oder Ergebnisse eines vergleichbaren Versuches bestätigt (Castro-Rivera & Safe 1998). Leblanc *et al.* beschrieben zudem bei Endometriumkarzinomzelllinien eine Proliferationssteigerung durch ICI 182,780 in Kombination mit Östrogen (Leblanc *et al.* 2007), schätzen die Wirkung der Substanz jedoch insgesamt als antagonistisch ein. Auch wirkungsinvertierende Punktmutationen am ER, wie sie Montano *et al.* 1996 oder Mahfoudi *et al.* 1995 nachwiesen, sind aufgrund des fehlenden Nachweises von ER $\alpha$  bei HEC-1B nicht in der Lage, diese Beobachtung zu erklären. Somit bleibt als Ursache für diesen Effekt möglicherweise eine Aktivierung alternativer Östrogenrezeptoren oder eine Wirkung am ER $\beta$  zu vermuten (vgl. Leblanc *et al.* 2007).



Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene stehen wiederum in Einklang mit den Beobachtungen der Proliferationsexperimente. Einerseits erklärt die fehlende ER $\alpha$ -Expression bei beiden Klonen durchaus die mangelnde Östrogenresponsivität, da ER $\alpha$  als klassischer Östrogenrezeptor weitreichend für die Vermittlung typischer Östrogenwirkungen wie Proliferationsförderung verantwortlich ist (Peng & Jordan 2008, S. 189). Im Gegensatz dazu waren die ER $\beta$ -Subtypen zwar nachweisbar, das Vorhandensein dieser Rezeptoren war jedoch nicht ausreichend, um eine zelluläre Antwort auf den Östrogenstimulus hervorzurufen. Auch die durch den *icb-1*-Knockdown verminderte Expression einzelner ER $\beta$ -Varianten (ER $\beta$ 1 und vor Allem ER $\beta$ 5) bei HEC-1B/*icb*KD war nicht in der Lage, einen biologisch relevanten Wachstumsvorteil dieser Zellen zu ermöglichen, obwohl ER $\beta$  antiproliferative Eigenschaften zugesprochen werden. Er moduliert die ER $\alpha$ -vermittelte Hormonwirkung und kann das Zellwachstum hemmen (Speirs & Shaaban 2009). Ebenso wenig führte die Herunterregulierung des Zellzyklusinhibitors *p21/WAF* sowie die Steigerung der Expression von *Cyclin A2* in serumhaltigem Milieu oder die Hochregulation von *FOS* in serumfreiem Medium zu einer Proliferationssteigerung beim HEC-1B-Knockdownklon, wenngleich dies aufgrund der entsprechenden Rolle der Gene bei der Zellzykluskontrolle beziehungsweise -progression durchaus denkbar gewesen wäre. Die isoliert veränderte Regulation dieser Gene war wohl nicht ausreichend, eine biologisch relevante Reaktion hervorzurufen. Dennoch unterstreicht sie die mögliche Bedeutung von *icb-1* bei der Proliferationshemmung oder Steigerung der Differenzierung.

Entsprechend der fehlenden Responsivität gegenüber Östradiol in den Proliferationsexperimenten war auch auf mRNA Ebene keine deutliche Veränderung klassischer ER $\alpha$ -Zielgene durch den hormonellen Stimulus zu beobachten. Der Progesteronrezeptor als wichtiger Indikator der Östrogenantwort war nicht nachweisbar, und auch typischerweise beeinflusste Gene wie *Cyclin D1* oder *FOS* wurden nicht alteriert, was wiederum die fehlende Sensibilität für Östrogene belegt. Lediglich der Zellzyklusinhibitor *p21/WAF1*, der bekanntlich durch Östrogene herunterreguliert wird (Prall *et al.* 2001), war bei beiden Klonen in Reaktion auf das Steroidhormon reduziert, signifikant gegenüber dem unstimulierten Zustand jedoch nur bei HEC-1B/*icb*KD ( $p=0,029$ ). Dies mag möglicherweise eine nicht über ER $\alpha$  vermittelte Reaktion darstellen (vgl. Peng & Jordan 2008, S.198f.) die durch den Knockdown wiederum verstärkt wurde. Hinsichtlich der Bedeutung von *icb-1* im Östrogensystem lässt sich aus der trotz des Knockdowns von *icb-1* fehlenden Östrogenresponsivität bei HEC-1B/*icb*KD im Gegensatz zum östrogensensiblen Phänotyp bei SK-OV-3/*icb*KD eine Abhängigkeit der Wirkung von *icb-1* vom Vorhandensein des ER $\alpha$  ableiten.

Die Effekte des *icb-1*-Knockdowns beschränkten sich bei der Endometriumkarzinomzelllinie dementsprechend lediglich auf die Ebene der Differenzierungsmarker. Hier ließ sich, wie

oben erwähnt, in unstimuliertem Zustand eine generelle Herunterregulierung verschiedener Differenzierungsmarker beobachten - darunter *Fibulin 1c*, *KRT8*, *GFI1* und *LALBA*. Dieser Verlust der Expression Differenzierungs-assoziiierter Gene bei verminderter Expression von *icb-1* ist wie bereits beschrieben wiederum als Hinweis auf die Bedeutung des Gens für Differenzierungsprozesse zu sehen.

#### **4.4. Gegenüberstellung der verschiedenen Zelllinien**

Bewertet man die Ergebnisse der verschiedenen Zelllinien in der Zusammenschau, so ergibt sich bei allen drei Zelllinien durch den Knockdown von *icb-1* ein Differenzierungsverlust, was die Rolle von *icb-1* bei Differenzierungsprozessen unterstreicht. Weiterhin führte der Knockdown zu einer verstärkten Östrogenresponsivität zweier ER $\alpha$ -positiver Zelllinien. Während bei SK-OV-3 eine Östrogenantwort durch den Knockdown überhaupt erst ermöglicht wurde und sich neben molekularen Veränderungen auch im Proliferationsverhalten der Zelllinie niederschlug, beschränkte sich die verstärkte Sensitivität für Östrogene bei MCF-7 auf die Genexpression. Die Ergebnisse beider Zelllinien deuten auf eine hemmende Rolle von *icb-1* im Zusammenhang mit der proliferativen Östrogenwirkung hin. Bei vollkommen gestörter Östrogenwirkung infolge des Fehlens von ER $\alpha$  wie im Falle von HEC-1B war die Ausschaltung von *icb-1* nicht in der Lage, eine Östrogenantwort hervorzurufen.

Zusammenfassend ist *icb-1* somit als neuer Einflussfaktor bei hormonabhängigen Krebserkrankungen zu sehen. Die generierten Daten zeigen, dass *icb-1* die Regulation der Expression von Östrogenrezeptoren in unterschiedlichem Maße beeinflusst. Es kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass *icb-1* an der Limitation des ER $\alpha$ -Transkript-Levels und der Aufrechterhaltung einer gewissen Expression von ER $\beta$  beteiligt ist. Somit hemmt es die Aktivierung von ER $\alpha$ -Zielgenen und die zelluläre Proliferation. Weiterhin legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass die Expression von *icb-1* zumindest in Teilen die Hormonresistenz von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen mit bedingt. Diese Feststellungen geben Anlass zu weiteren Untersuchungen zur Rolle von *icb-1* bei hormonabhängigen Krebserkrankungen.

## 5. Zusammenfassung

Das humane Gen *icb-1* (*C1orf38* - chromosome 1 open reading frame 38) wurde ursprünglich in Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen bei Krebszellen beschrieben. Kürzlich wurde eine Regulation von *icb-1* durch Östrogene festgestellt und ein Östrogen-Response-Element (ERE) in seinem Promoter nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Bedeutung von *icb-1* im Rahmen der östrogenabhängigen Proliferations-regulation von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen untersucht, deren *icb-1*-Level durch stabile Expression von *icb-1*-shRNA vermindert war. Als Zellkulturmodelle hierfür dienten die östrogen-abhängige Brustkrebszelllinie MCF-7, die hormon-unabhängigen Ovarialkarzinomzellen SK-OV-3 sowie die sowohl für Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) als auch für den Progesteronrezeptor (PR) negative Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B. Es wurden Proliferationsassays und Genexpressionsanalysen unter standardisierten Wachstumsbedingungen sowie unter Einfluss von 17- $\beta$ -Östradiol oder Antiöstrogenen durchgeführt.

Im Rahmen der Experimente konnte zunächst die Rolle von *icb-1* bei Differenzierungsprozessen bestätigt werden, da infolge der verminderten Expression dieses Gens eine Downregulation von Differenzierungsmarkern wie des Epithelzellmarkers *KRT8* bei allen drei Zelllinien sowie von *GFI1* und *LALBA* bei HEC-1B zu beobachten war. Ebenso bestätigte sich die vermutete Bedeutung von *icb-1* im Östrogensystem: Der Knockdown von *icb-1* ermöglichte eine signifikante proliferative Östrogenantwort der zuvor hormonresistenten SK-OV-3-Zellen. Diese Transformation von SK-OV-3 in einen hormonsensiblen Phänotyp ging einher mit einer Hochregulation von ER $\alpha$  und einer signifikanten Verringerung der mRNA-Level von ER $\beta$ . Ebenso war die Expression östrogen-responsiver Gene wie *Fibulin 1c*, *FOS* oder des PR bei SK-OV-3-Zellen mit stabiler Expression der *icb-1*-shRNA erhöht. Dass der *icb-1*-Knockdown auch bei MCF-7 ähnliche Effekte in Bezug auf die Genexpression bewirkte, unterstützt die Annahme einer generellen Rolle von *icb-1* bei der zellulären Östrogenantwort. Bei der rezeptornegativen Zelllinie HEC-1B hingegen fehlten diese Veränderungen, was auf eine Abhängigkeit der Effekte von ER $\alpha$  hindeutet.

Die vorliegenden Daten lassen somit eine antagonistische Funktion des differenzierungsassoziierten Gens *icb-1* auf die zelluläre Östrogenantwort vermuten, wodurch auch die östradiol-getriggerte Proliferation gehemmt werden kann. Die molekularen Mechanismen dieses inhibitorischen Effekts von *icb-1* auf zelluläre Östrogensignalwege könnten auf der Begrenzung der Transkriptkopien von ER $\alpha$  bei gleichzeitigem Erhalt hoher ER $\beta$ -Level beruhen. Hierdurch würden sowohl die Transkription östrogen-responsiver Gene

als auch das Zellwachstum gehemmt. Die Identifikation von *icb-1* als neuem Einflussfaktor bei endokrin stimulierten Karzinomen gibt Anlass für weitere Studien zur Bedeutung dieses Gens bei der Krebsentstehung und möglichen Therapieansätzen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Speziell in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

.../control	Kontrollklon der entsprechenden Zelllinie
.../icbKD	<i>icb-1</i> -Knockdownklon der entsprechenden Zelllinie

Allgemeines Abkürzungsverzeichnis spezieller Fachausdrücke und im Text beschriebener  
Methoden, Substanzen, Moleküle oder Gene :

(Gennamen nach HUGO Gene Nomenclature Committee ([genenames.org](http://genenames.org)))

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Vitamin D3
AF-1 und AF-2	Activation-Function-1 und -2
AP1	Aktivator-Protein 1
ATRA	all-trans-Retinsäure
Bax	Co-Faktor des Tumorsuppressors p53
BCL-2	B-cell lymphoma 2, Regulator der Apoptose
bp	Basenpaare
BRAF	rapidly growing fibrosarcoma/ rat fibrosarcoma Isoform B
BRCA1 und 2	breast cancer 1 u.2, early onset
C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CDK2	cyclin-dependent kinase 2
CDKN1A/ p21/ WAF1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CTB-Assay	Cell-Titre-Blue™-Assay
CTNNB1	β-Catenin
CycA2	CCNA2, Cyclin A2
CycD1	CCND1, Cyclin D1
CycE	CCNE1, Cyclin E
CycG2	CCNG2, Cyclin G2
DBD	DNA-Bindungs-Domäne

DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPN	2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile
E2	17- $\beta$ -Östradiol
E2F	E2F transcription factor
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Östrogen responsives Element (engl.: estrogen responsive element)
ESR1 und 2	Östrogenrezeptor 1 und 2 (engl.:estrogen receptor 1/2)
FBLN1/ FIB1/ Fibulin1c	Fibulin 1c
FBS	fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum)
FOS	c-fos, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
G0-, G1-, G2-, S-, M-Phase	Zellzyklusphasen (G0: Ruhephase, G1: postmitotische Phase/ Präsynthesephase, G2: prämitotische Phase / Postsynthesephase, S: Synthesephase, M:Mitose)
G1, G2, G3, G4	Gradingstufen (G1: gut differenziertes bösartiges Gewebe, G2: mäßig differenziert, G3: schlecht differenziert, G4: nicht differenziert)
G-418	G-418-Sulphat
GFI-1	GFI1, Growth-Factor-Independence-1/ growth factor independent 1 transcription repressor

GPR30	GPER, G protein-coupled estrogen receptor 1
Grb-2	GRB2, growth factor receptor-bound protein 2
HAMLET	human $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells
HER2/neu / erbb2	ERBB2, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
Hsp-70 und -90	Heat-shock-Protein 70 und 90
ICI 182,780	Fulvestrant, Markenname Faslodex, 13-methyl-7-[9-( 4,4,5,5,5- pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]- 7,8,9,11,12,13,14,15,16, 17-decahydro- 6 <i>H</i> -cyclopenta[a] phenanthrene-3,17-diol
icb-1	C1orf38, induced by contact to basement membrane 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
INK4	CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
JUN	c-jun, jun proto-oncogene
KAL-1	KAL1, Kallmann syndrome 1 sequence
KRAS	k-ras, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRT8	Keratin 8
LALBA	$\alpha$ -Lactalbumin
LMK	Lösungsmittelkontrolle
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger RNA
MLH1 und MSH2, MSH6	Gene des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems, mutiert bei nicht polypösem, hereditärem Kolonkarzinom (HNPCC)

M-Phase	Mitosephase (s. auch unter G0-Phase)
MYC	c-myc, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, (engl.: Non Small Cell Lung Cancer)
NO	Stickstoffmonoxid
p15, 21, 27...	CDKN2B, CDKN1A, CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, 1A, 1B)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate Buffer Saline)
PPT	4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PGR	Progesteronrezeptor
RB	RB1, retinoblastoma 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCC	Plattenepithelkarzinom (engl.: Squamous Cell Carcinoma)
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: Small Cell Lung Cancer)
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator (engl.: Selective Estrogen Receptor Modulator)
shRNA	short hairpin RNA/ Hairpin siRNA
Sp1	SP1, Sp1 transcription factor
S-Phase	Synthesephase (s. auch unter G0-Phase)
SR2	Serum Replacement 2
Tamoxifen/ TAM/ 4-OH-Tamoxifen	(Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Themis	THEMIS, thymocyte selection associated



## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des humanen Gens <i>icb-1</i> (aus Treeck et al. 1998, S. 428)	S.8
Abb.2	Schematischer Vergleich der Struktur des humanen ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ . (aus Peng & Jordan, S.190)	S.12
Abb.3	Chemische Strukturformeln von Östradiol, ICI 182,780 (Fulvestrant), Tamoxifen und Raloxifen (Howell 2006, S.690)	S.15
Abb.4	Schematisches Modell des Zellzyklus bei Säugetieren (aus d'Andrilli et al. 2007, S.4)	S.17
Abb.5	Konzentrationsänderungen der Cykline während des Zellzyklus (aus Krauss 2003, S.440)	S.18
Abb.6	Nachweis des Knockdowns von <i>icb-1</i> in den Zelllinien SK-OV-3, MCF-7, HEC-1B (real-time-RT-PCR)	S.41
Abb.7	Proliferation von SK-OV-3/ <i>icb</i> KD, MCF-7/ <i>icb</i> KD, HEC-1B/ <i>icb</i> KD a) in DMEM/F12 + 10% FBS (CTB-Assay) b) in DMEM/F12 + 1x SR2 (CTB-Assay)	S.43
Abb.8	Proliferation von SK-OV-3/ <i>icb</i> KD, MCF-7/ <i>icb</i> KD, HEC-1B/ <i>icb</i> KD und jeweilige Kontrollklone in DMEM/F12 + 3nM E2 (CTB-Assay)	S.44
Abb.9	Dosis-Wirkungs-Analysen mit verschiedenen Konzentrationen E2 ( $3 \times 10^{-11}$ M - $3 \times 10^{-8}$ M) (CTB-Assay)	S.45
Abb.10	Dosis-Wirkungs-Analysen mit PPT und DPN ( $10^{-9}$ M - $10^{-6}$ M) (CTB-Assay)	S.48
Abb.11	Proliferation von SK-OV-3-Klonen nach Stimulation mit a) 4-OH-Tamoxifen (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 b) ICI 182, 780 (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 (CTB-Assay)	S.51
Abb.12	Apoptose bei SK-OV-3-Klonen nach Stimulation mit a) Staurosporin (0,01 $\mu$ M - 1 $\mu$ M) b) 4-OH-Tamoxifen (5 $\mu$ M - 25 $\mu$ M + 3 nM E2) (Caspase-Glo™ 3/7-Assay)	S.52
Abb.13	Proliferation von MCF-7-Klonen nach Stimulation mit a) 4-OH-Tamoxifen (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2	

	b) ICI 182, 780 (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 (CTB-Assay)	S.54
Abb.14	Apoptose bei MCF-7-Klonen nach Stimulation mit a) Staurosporin (0,01 $\mu$ M - 1 $\mu$ M) b) 4-OH-Tamoxifen (1 $\mu$ M - 25 $\mu$ M + 3 nM E2) (Caspase-Glo™ 3/7-Assay)	S.56
Abb.15	Proliferation von HEC-1B-Klonen nach Stimulation mit a) 4-OH-Tamoxifen (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 b) ICI 182, 780 (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 (CTB-Assay)	S.58
Abb.16	Apoptose bei HEC-1B-Klonen nach Stimulation mit a) Staurosporin (0,01 $\mu$ M - 1 $\mu$ M) b) 4-OH-Tamoxifen (5 $\mu$ M - 25 $\mu$ M + 3 nM E2) (Caspase-Glo™ 3/7-Assay)	S.59
Abb.17	Durch den Knockdown von <i>icb-1</i> bedingte Änderungen der Genexpression in serumhaltigem Kulturmedium (DMEM/F12 + 10% FBS) (real-time-RT-PCR) a) Hormonrezeptorprofil b) Östrogenresponsive Gene und Zellzyklusregulatoren c) Differenzierungsassoziierte Gene	S.62
Abb.18	Durch den <i>icb-1</i> -Knockdown bedingte Änderungen der Genexpression in serumfreiem Kulturmedium (DMEM/F12 + 1x SR2) (real-time-RT-PCR) a) Hormonrezeptorprofil b) Östrogenresponsive Gene und Zellzyklusregulatoren c) Differenzierungsassoziierte Gene	S.65
Abb.19	Durch den Knockdown des Gens <i>icb-1</i> bedingte Änderungen der Genexpression nach Stimulation mit 3nM E2 (DMEM/F12 + 1xSR2) (real-time-RT-PCR)	S.68
Abb.20	Durch den <i>icb-1</i> -Knockdown bedingte Änderungen der Genexpression nach Stimulation mit 4-OH-Tamoxifen (1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M) + 3 nM E2 (DMEM/F12 + 1xSR2) (real-time-RT-PCR)	S.73

## 8. Literaturverzeichnis

Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Reis-Filho JS, Lee AH & Ellis IO 2008 Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. *The American Journal of Surgical Pathology* **32** 513-523.

Acconcia F, Barnes CJ & Kumar R 2006 Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology* **147** 1203-1212.

D'Andrilli G, Bovicelli A & Giordano A 2007 The Cell Cycle and the Molecular Biology of Cancer. In: Giordano A, Bovicelli A & Kurmann RJ 2007 Molecular Pathology of Gynecologic Cancer (=Current Clinical Oncology), Totowa New Jersey, Humana Press. 3-14

Albanito L, Sisci D, Aquila S, Bruella E, Vivacqua A, Madeo A, Lappano R, Pandey DP, Picard D, Mauro L, Andò S & Maggiolini M. 2008 Epidermal growth factor induces G protein-coupled Receptor 30 Expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology* **149** 3799-3808.

Allan G, Campen C, Hodgen G, Williams R, Charnock-Jones DS, Wan J, Erlander M & Palmer S 2003 Identification of genes with differential regulation in primate endometrium during the proliferative and secretory phases of the cycle. *Endocrine Research* **29** (1) 53-65.

Arooz T, Yam CH, Siu WY, Lau A, Li KK & Poon RY 2000 On the concentrations of cyclins and cyclin-dependent kinases in extracts of cultured human cells. *Biochemistry* **39** 9494-9501.

Assikis VJ & Jordan VC 1995 Gynecologic effects of tamoxifen and the association with endometrial carcinoma. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* **49** 241-247.

Baltzer A, Svanborg C & Jaggi R 2004 Apoptotic cell death in the lactating mammary gland is enhanced by a folding variant of  $\alpha$ -lactalbumin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61** 1221-1228.

Bansal N, Yendluri V & Wenham RM 2009 The molecular Biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* **16** 8-13.

Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P & Lazennec G 2004 Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Research* **64** 5861-5869.

Bates S & Peters G 1995 Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Seminars in Cancer Biology* **6** 73-82.

Bollmann J, Ortmann O & Treeck O 2008 Expression of differentiation-associated gene icb-1 is estrogen-responsive in ovarian and breast cancer cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **109** 16-21.

Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, Dotti I, Gorji N & Stanta G 2008 Molecular characterisation of breast cancer patients at high and low recurrence risk. *Virchows Archiv* **452**(3) 241-250.

Borellini F & Oka T 1989 Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. *Environmental Health Perspectives* **80** 85-99.

De Bortoli M, Dati C, Antoniotti S, Maggiora P & Sapei ML 1992 Hormonal regulation of c-erbB-2 oncogene expression in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **43** 21-25.

Brooks SC, Locke ER & Soule HD 1973 Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* **248** 6251-6253.

van der Burg B, van Selm-Miltenburg AJ, de Laat SW & van Zoelen EJ 1989 Direct effects of estrogen on c-fos and c-myc protooncogene expression and cellular proliferation in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **64** 223-228.

Casanova ML, Bravo A, Martínez-Palacio J, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Larcher F, Conti CJ & Jorcano JL 2004 Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *FASEB Journal* **18** 1556-1558.

Castro-Rivera E & Safe S 1998 Estrogen- and Antiestrogen-responsiveness of HEC1A Endometrial Adenocarcinoma Cells in Culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **64**(5-6) 287-295.

Cheng J, Lee EJ, Madison LD & Lazennec G 2004 Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Letters* **566** 169-172.

Cicatiello L, Addeo R, Altucci L, Belsito Petrizzi V, Boccia V, Cancemi M, Germano D, Pacilio C, Salzano S, Bresciani F & Weisz A 2000 The antiestrogen ICI 182,780 inhibits proliferation of human breast cancer cells by interfering with multiple, sequential estrogen-regulated processes required for cell cycle completion. *Molecular and Cellular Endocrinology* **165** (1-2) 199-209.

Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B & Weisz A.. 2004 Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing

transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Molecular and Cellular Biology* **24** 7260-7274.

Clinton GM, Rougeot C, Derancourt J, Roger P, Defrenne A, Godyna S, Argraves WS & Rochefort H 1996 Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *PNAS* **93** 316-320.

McClelland RA, Manning DL, Gee JM, Anderson E, Clarke R, Howell A, Dowsett M, Robertson JF, Blamey RW, Wakeling AE & Nicholson RI 1996 Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes. *Breast Cancer Research and Treatment* **41** 31-41.

Clemons M, Danson S & Howell A 2002 Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer Treatment Reviews* **28** 165-180.

Clinton GM, Rougeot C, Derancourt J, Roger P, Defrenne A, Godyna S, Argraves WS & Rochefort H 1996 Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *PNAS* **93** 316-320.

MacColl G, Bouloux P & Quinton R 2002 Kallmann Syndrome: Adhesion, Afferents, and Anosmia. *Neuron* **34** 675–678.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S & Parkers MG 1997 Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA *The Journal of Biological Chemistry* **272** 19858-19862.

Cowley SM & Parker MG 1999 A comparison of transcriptional activation by ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **69** 165-175.

Cunat S, Hoffmann P & Pascal Pujol 2004 Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **94** 25–32.

Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S & Boyle P 2003 Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* **361** 296–300.

Dauvois S, Danielian PS, White R & Parker MG 1992 Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *PNAS U S A* **89** 4037-4041.

Dauvois S, White R & Parker MG 1993 The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Science* **106** 1377-1388.

Dickson RB, Bates SE, Mc Manaway ME & Lippmann ME 1986 Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Research* **46** 1707-1713.

- Diel P, Smolnikar K & Michna H 1999 The pure antiestrogen ICI 182780 is more effective in the induction of apoptosis and down-regulation of BCL-2 than tamoxifen in MCF-7 cells. *Breast Cancer and Research and Treatment* **58** 87-97.
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA & Sutherland RL. 2003 Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine Related Cancer* **10** 179-186.
- Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, Colás E, Llauradó M, Alazzouzi H, Planagumá J, Lohmann MA, Garcia J, Castellvi S, Ramon y Cajal J, Gil-Moreno A, Xercavins J, Alameda F & Reventós J 2008 Novel molecular profiles of endometrial cancer – new light through old windows. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **108** 221-229.
- Ellenson LH 2007 Endometrial Carcinoma – Molecular Genetic Aspects. In: Giordano A, Bovicelli A & Kurmann RJ 2007 Molecular Pathology of Gynecologic Cancer (=Current Clinical Oncology). Humana Press, Totowa New Jersey. 91-100
- Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V & Balaguer P 2006 Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochemical Pharmacology* **71**(10) 1459-1469.
- Fader AN, Arriba LN, Frasure HE & von Gruenigen VE. 2009 Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecologic Oncology* **114** 121-127.
- Ferlini C, Scambia G, Marone M, Distefano M, Gaggini C, Ferrandina G, Fattorossi A, Isola G, Benedetti Panici P & Mancuso S 1999 Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *British Journal of Cancer* **79** 257-263.
- Forti S, Scanlan MJ, Invernizzi A, Castiglioni F, Pupa S, Agresti R, Fontanelli R, Morelli D, Old LJ, Pupa SM & Ménard S 2002 Identification of breast cancer-restricted antigens by antibody screening of SKBR3 cDNA library using a preselected patient's serum. *Breast Cancer Research and Treatment* **73**(3) 245-56.
- Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KCN, Lyttle CR & Katzenellenbogen BS 2003 Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insight into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* **144** 4562-4574.
- Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR & Katzenellenbogen BS 2004 Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Research* **64** 1522-1533.

- Fuchs IB, Lichtenegger W, Buehler H, Henrich W, Stein H, Kleine-Tebbe A & Schaller G 2002 The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Anticancer Research* **22** 3415-3419.
- Gallagher WM, Currid CA and Whelan LC 2005 Fibulins and cancer: friend or foe?. *TRENDS in Molecular Medicine* **11** (7) 336-340.
- Galtier-Dereure F, Capony F, Maudelonde T & Rochefort H 1992 Estradiol Stimulates Cell Growth and Secretion of Procathepsin D and a 120-Kilodalton Protein in the Human Ovarian Cancer Cell Line BG-1\*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **75** (6) 1497-1502.
- Gava N, L Clarke C, Bye C, Byth K & deFazio A.2008 Global gene expression profiles of ovarian surface epithelial cells in vivo. *Journal of Molecular Endocrinology* **40** 281-296.
- Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C 2005 Brustkrebs. (= Robert Koch-Institut (Hrsg.) Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 25), [www.rki.de](http://www.rki.de) ([http://www.rki.de/cln\\_151/nn\\_204544/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/Themenhefte/themenhefte\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_151/nn_204544/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/Themenhefte/themenhefte__node.html?__nnn=true))
- Gong Y, Murphy LC & Murphy LJ 1994 Hormonal regulation of proliferation and transforming growth factors gene expression in human endometrial adenocarcinoma xenografts. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **50** 13-19.
- Greene LM, Twal WO, Duffy MJ, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, McCann AH, Dervan PA, Argraves WS & Gallagher WM 2003 Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer. *British Journal of Cancer* **88** 871–878.
- Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, AND Tsichlis PN 1996 (a) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by Interleukin-2 withdrawal. *Molecular and Cellular Biology* **16** 6263–6272
- Grimes HL, Gilks CB, Chan TO, Porter S & Tsichlis PN. 1996 (b) The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *PNAS U S A* **93** 14569-14573.
- Guo R, Wei L, Qiao Y, Wang J & Tang J 2006 Blockage of PI3K/PKB/P27kip1 signaling pathway can antagonize 17- $\beta$ -estradiol-induced Ishikawa proliferation and cell-cycle progression. *Chinese Medical Journal (Engl.)* **119** 242-245.
- Haendler B, Yamanouchi H, Lessey BA, Chwalisz K & Hess-Stumpp H 2004 Cycle-dependent endometrial expression and hormonal regulation of the fibulin-1 gene. *Molecular Reproduction and Development* **68**(3) 279-287.
- Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H & Svanborg C 1995 Apoptosis induced by a human milk protein. *PNAS USA* **92** 8064-8068.

Hall FL, Williams RT, Wu L, Wu F, Carbonaro-Hall DA, Harper JW & Warburton D 1993 Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein.

*Oncogene* **8** 1377-1384.

Hardelin J-P 2001 Kallmann syndrome: towards molecular pathogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **179** 75-81.

Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA & Katzenellenbogen BS 2003 Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **206**(1-2) 13-22.

Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA & Creasman WT 1991 Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A gynecologic oncology group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer* **68** 269-271.

Hayashido Y, Lucas A, Rougeot C, Godyna S, Argraves WS & Rochefort H 1998 Estradiol and Fibulin-1 inhibit motility of human ovarian- and breast-cancer cells induced by fibronectin. *International Journal of Cancer* **75** 654–658.

Hodges-Gallagher L, Valentine CD, El Bader S & Kushner PJ. 2008 Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **109**(2) 241-50.

Howell A 2006 Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocrine Related Cancer* **13** 289-706.

Hu Y, Tanriverdi F, MacColl GS, Bouloux P-MG 2003 Kallmann's syndrome: molecular pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **35** 1157–1162.

Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H & Clinton GM 1995 SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogens and anti-estrogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55** 279-289.

Huober J, Grischke EM & Marmé A 2004 Ovarialkarzinom. In: Hiddemann W, Huber H & Bartram CR (Hrsg.) 2004 Die Onkologie; Teil 2; Solide Tumoren ; Lymphome ; Leukämien Springer, Berlin Heidelberg. 1057-1072.

Iwaya K, Ogawa H, Mukai Y, Iwamatsu A & Mukai K 2003 Ubiquitin-immunoreactive degradation products of cytokeratin 8/18 correlate with aggressive breast cancer. *Cancer Science* **94**(10) 864-870.

Jahn I, Eberle A, Niehues C, Birn A und Horch K 2007 Gebärmuttererkrankungen. (= Robert Koch-Institut (Hrsg.) Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 37), [www.rki.de](http://www.rki.de)



([http://www.rki.de/clin\\_151/nn\\_204544/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/Themenhefte/themenhefte\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/clin_151/nn_204544/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/Themenhefte/themenhefte__node.html?__nnn=true))

Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi S-Y, Crockford TL, Lambe T, Domaschensz H, Kucharska EM, Zheng L, Vinuesa CG, Lenardo MJ, Goodnow CC, Cornall RJ & Schwartz RH 2009 Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nature Immunology* **10** (8) 831-839.

Jonat W, Bauerschlag D, Schem C, Maass-Poppenhusen K, Maass N, Löning M, Friedrich M, Lehmann-Willenbrock E, Bonatz G, Pfisterer J, Schollmeyer T & Kiechle M 2007 Gut- und bösartige gynäkologische Tumoren. In: Gynäkologie und Geburtshilfe, edn 2, pp 211-298. Ed Diedrich K, Schultze-Mosgau A, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-T M. & Weiss JM, Springer, Heidelberg.

Jones J, Lagasse LD & Karlan BY 1994 Steroid hormonal independence of HER2/neu mRNA expression in four human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology* **55** 421-426.

Karst AM & Drapkin R 2010 Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of Oncology* **2010** 1-13.

Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Uchikawa J, Kurai M & Konishi I 2009 Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by up-regulation of cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-Related Cancer* **16** 113-122.

Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ & Berthois Y. 1987 Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Research* **47**(16) 4355-60.

Kaufmann M & Gätje R 2004 Endometriumkarzinom. In: Hiddemann W, Huber H & Bartram CR (Hrsg.) 2004 Die Onkologie; Teil 2; Solide Tumoren ; Lymphome ; Leukämien Ed, Springer, Berlin Heidelberg. 1073-1094.

Kawamata H, Furihata T, Omotehara F, Sakai T, Horiuchi H, Shinagawa Y, Imura J, Ohkura Y, Tachibana M, Kubota K, Terano A & Fujimori T 2003 Identification of genes differentially expressed in a newly isolated human metastasizing esophageal cancer cell line, T.Tn-AT1, by cDNA microarray. *Cancer Science* **94** 699-706.

Kazanjan A, Wallis D, Au N, Nigam R, Venken KJT, Cagle PT, Dickey BF, Bellen HJ, Gilks CB & Grimes LH 2004 Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Research* **64** 6874–6882.

Kazanjian A, Gross EA & Grimes HL 2006 The growth factor independence-1 transcription factor: new functions and new insights. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* **59**(2) 85-97.

Kiechle M, Harbeck N & Heinemann V 2004 Mammakarzinom. In: Hiddemann W, Huber H & Bartram CR (Hrsg.) 2004 Die Onkologie; Teil 2; Solide Tumoren ; Lymphome ; Leukämien. Springer, Berlin Heidelberg. 1009-1056.

Kleinberg DL, Todd J & Babitsky G 1983 Inhibition by estradiol of the lactogenic effect of prolactin in primate mammary tissue: reversal by antiestrogens LY 156758 and tamoxifen. *PNAS USA* **80**(13) 4144-4148.

Kleuser B, Melek D, Gust R, Petz HH & Potteck H 2008 17- $\beta$ -estradiol inhibits transforming growth factor- $\beta$  signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Molecular Pharmacology* **74** 1533-1543.

Krauss G (Hrsg.) 2003. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation 2003, 3.Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim. 151-177 (Signaling by Nuclear Receptors), 469-509 (Malfunction of Signaling Pathways and Tumorigenesis: Oncogenes and Tumor Suppressor Genes), 511-532 (Apoptosis).

Lau KM, Mok SC & Ho SM 1999 Expression of human estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$ , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *PNAS USA* **96** 5722-5727.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C & Vignon F 2001 ER $\beta$  inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* **142** 4120-4130.

Leblanc K, Sexton E, Parent S, Bélanger G, Déry MC, Boucher V & Asselin E 2007 Effects of 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on survival of uterine cancer cell lines in the presence and absence of exogenous estrogens. *International Journal of Oncology* **30** 477-487.

Lee SH & Sinko PJ 2006 siRNA--getting the message out. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **27**(5) 401-410.

Lewis JS, Vijayanathan V, Thomas TJ, Pestell RG, Albanese C, Gallo MA & Thomas T 2005 Activation of cyclin D1 by estradiol and spermine in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism involving the p38 MAP kinase and phosphorylation of ATF-2. *Oncology Research* **15** 113-128.

Long X and Nephew KP 2006 Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent Interacting Proteins Mediate Immobilization and Degradation of Estrogen Receptor- $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry* **281** 9607 – 9615.

- Lykkesfeldt AE, Madsen MW & Briand P 1994 Altered expression of estrogen-regulated genes in a tamoxifen-resistant and ICI 164,384 and ICI 182,780 sensitive human breast cancer cell line, MCF-7/TAMR-1. *Cancer Research* **54** 1587-1595.
- Macaluso M, Montanari M, Noto PB, Gregorio V, Surmacz E & Giordano A. 2006 Nuclear and cytoplasmic interaction of pRb2/p130 and ER- $\beta$  in MCF-7 breast cancer cells. *Annals of Oncology* **17** vii27- vii29.
- Mahfoudi A, Roulet E, Dauvois S, Parkers MG & Wahli W 1995 Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *PNAS USA* **92** 4206-4210.
- Malumbres M 2008 Cyclin dependent kinases and their regulators as potential targets for anticancer therapeutics. In: MH Bronchud (Hrsg.) 2008 Principles of Molecular Oncology, 3. Auflage, Humana Press Totowa, NJ. 207-237
- van der Meer LT, Jansen JH & van der Reijden BA 2010 Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* **24**(11) 1834-1843.
- Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. 2001 Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**(24):4230-4251.
- Moll F, Katsaros D, Lazennec G, Hellio N, Roger P, Giacalone PL, Chalbos D, Maudelonde T, Rochefort H & Pujol P 2002 Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. *Oncogene* **21** 1097-1107.
- Montano MM, Ekena K, Krueger KD, Keller AL & Katzenellenbogen BS 1996 Human estrogen receptor ligand activity inversion mutants: receptors that interpret antiestrogens as estrogens and estrogens as antiestrogens and discriminate among different antiestrogens. *Molecular Endocrinology* **10**(3) 230-242.
- Möröy T 2005 The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37** 541–546.
- Nakamoto T, Okada H, Nakajima T, Ikuta A, Yasuda K & Kanzaki H 2005 Progesterone induces the fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Human Reproduction* **20** (6) 1447–1455.
- Nieminen TT, Gylling A, Abdel-Rahman WM, Nuorva K, Aarnio M, Renkonen-Sinisalo L, Järvinen HJ, Mecklin JP, Bützow R & Peltomäki P 2009 Molecular analysis of endometrial tumorigenesis: importance of complex hyperplasia regardless of atypia. *Clinical Cancer Research* **15**(18) 5772-5783.

- Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, Manning DL & Nicholson RI 1995 Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **87** 746-50.
- Peng J & Jordan VC 2008 Estrogen Receptor Pathways and Breast Cancer. In: MH Bronchud (Hrsg.) 2008 Principles of Molecular Oncology. 3. Auflage, Humana Press, Totowa, NJ. 189-206.
- Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L & Press MF 1993 Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic Reviews* **15** 17-30.
- Prall OWJ, Carroll JS & Sutherland RL 2001 A low abundance pool of nascent p21WAF1/Cip1 is targeted by estrogen to activate Cyclin E Cdk2. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 45433-45442.
- Pujol P, Rey J-M, Nirde P, Roger P, Gestaldi M, Laffargue F, Rochefort H & Maudelonde T 1998 Differential Expression of estrogen receptor - $\alpha$  and - $\beta$  messenger RNAs as potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Research* **58** 5367-5373.
- Pupa SM, Argraves SW, Forti S, Casalini P, Berno V, Agresti R, Aiello P, Invernizzi A, Baldassari P, Twal WO, Mortarini R, Anichini A & Ménard S 2004 Immunological and pathobiological roles of fibulin-1 in breast cancer. *Oncogene* **23** 2153–2160.
- Rae JM & Johnson MD 2005 What does an orphan G-protein coupled receptor have to do with estrogen?. *Breast Cancer Research* **7** 243-244.
- Read LD, Keith D Jr., Slamon DJ & Katzenellenbogen BS 1990 Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogene messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Research* **50** 3947-3951.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB & Prossnitz ER: 2005 A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307** 1625-1630.
- Ruedl C, Cappelletti V, Coradini D, Granata G & Di Fronzo G 1990 Influence of culture conditions on the estrogenic cell growth stimulation of human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **37**(2) 195-200.
- Rugarli EI 1999 Kallmann Syndrome and the link between olfactory and reproductive development. *American Journal of Human Genetics* **65** 943-948.
- Russel KS & Hung MC 1992 Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Research* **52** 6624-6629.
- Sabbah M, Courilleau D, Mester J and Redeuilh G 1999 Estrogen induction of cyclin D1 promotor: Involvement of a cAMP response-like element. *PNAS USA* **96** 11217-11222.

- Saleque S, Cameron S & Orkin SH 2002 The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes & Development* **16** 301–306
- Schmidt T, Karsunky H, Gau E, Zevnik B, Elsässer H-P & Mörry T 1998 Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* **17** 2661 – 2667.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G & Genazzani RA 2004 Genomic and non.genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* **69** 537-542.
- Sharp JA, Lefèvre C & Nicholas KR 2008 Lack of functional alpha-lactalbumin prevents involution in Cape fur seals and identifies the protein as an apoptotic milk factor in mammary gland involution. *BMC Biology* **6** 6:48.
- Speirs V & Shaaban AM 2009 Role of ER $\beta$  in Clinical Breast Cancer. In: Fuqua SAW (Hrsg.) 2009 Hormone Receptors in Breast Cancer (=Cancer Treatment and Research, 147). Springer, New York. 17-36.
- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA 2001 Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**(26):4934-4947.
- Svensson M, Håkansson A, Mossberg A-K, Linse S & Svanborg C 2000 Conversion of a-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *PNAS USA* **97** 4221-4226.
- Szijan I, Parma DL & Engel NI 1992 Expression of c-myc and c-fos protooncogenes in the anterior pituitary gland of the rat. Effect of estrogen. *Hormone and Metabolic Research* **24** 154-157.
- Thomas P & Dong J 2006 Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **102** 175-179.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J 2005 Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146** 624-632.
- Treeck O, Strunck E & Vollmer G 1998 A novel basement membrane-induced gene identified in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC1B. *FEBS Letters* **425** 426-430.
- Treeck O, Odani T, Itoh N, Imai H, Fujita S, Kohroki J, Nakanishi T, Diedrich K, Ortmann O & Tanaka K 2002 Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *Leukemia Research* **26** 765-769.

- Treeck O, Kindzorra I, Pauser K, Treeck L & Ortmann O 2005 Expression of icb-1 gene is interferon-gamma inducible in breast and ovarian cancer cell lines and affects the IFN gamma-response of SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Cytokine* **32** 137-142.
- Treeck O, Wackwitz B, Haus U & Ortmann O 2006 Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells. *Gynecologic Oncology* **102** 292-299.
- Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Latrich C, Piendl G & Ortmann O 2007 Estrogen receptor  $\beta$  exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Journal of Endocrinology* **193** 421-433.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F & Giguère V 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* **11** 353-365.
- La Vecchia C, Levi F & Lucchini F 1992 Descriptive epidemiology of male breast cancer in Europe. *International Journal of Cancer* **51** 62-66.
- Vendrell JA, Magnino F, Danis E, Duchesne MJ, Pinloche S, Pons M, Birnbaum D, Nguyen C & Theillet C, Cohen PA 2004 Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *Journal of Molecular Endocrinology* **32** 397-414.
- Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM & Pedraza V. 1995 The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environmental Health Perspectives* **103**(9):844-850.
- Waladali W, Luo Y, Li WS, Zheng MX, Hu QL 2009 17Beta-estradiol affects the proliferation and apoptosis of rat bladder neck smooth muscle cells by modulating cell cycle transition and related proteins. *World Journal of Urology* **27** 241-248. (Epub 2008)
- Walker LC, Harris GC, Holloway AJ, McKenzie GW, Wells JE, Robinson BA & Morris CM 2007 Cytokeratin KRT8/18 expression differentiates distinct subtypes of grade 3 invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **178** 94-103.
- Wang DY, McKague B, Liss SN & Edwards EA. 2004 Gene expression profiles for detecting and distinguishing potential endocrine-disrupting compounds in environmental samples. *Environmental Science & Technology* **38**(23) 6396-6406.
- Wijayarathne AL, Nagel SC, Paige LA, Christensen DJ, Norris JD, Fowlkes DM & McDonnell DP 1999 Comparative analyses of mechanistic differences among antioestrogens. *Endocrinology* **140** 5828–5840.

R. Yashwanth, S. Rama, M. Anbalagan & A. Jagannadha Rao 2006 Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **246** 114–120.

Zhang Y, Liao Q, Chen C, Yu & Zhao J 2006 Function of estrogen receptor isoforms alpha and beta in endometrial carcinoma cells. *International Journal of Gynecological Cancer* **16** 1656-1660.

Zweidler-McKay PA, Grimes HL, Flubacher MM, AND Tschlis PN 1996 Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Molecular and Cellular Biology* **16** 4024–4034.

## 9. Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen Materialien möchte ich mich herzlich bei Lehrstuhlinhaber Herr Prof. Dr. med. Olaf Ortmann bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt weiterhin Herrn PD Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der diese Dissertation von der Konzipierung über die praktische Ausführung und Auswertung bis hin zur schriftlichen Ausformulierung und kritischen Diskussion begleitet und unterstützt hat. Sein fachkundiger Rat, seine wissenschaftliche Begeisterung und stete Motivation haben außerordentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich Frau Helena Lowack und Herrn Gerhard Piendl für die geduldige und professionelle Einführung in die labortechnischen Methoden danken. Vielen Dank ebenfalls an Frau Anette Stegerer und die anderen Mitglieder des Laborteams für den jederzeit fachkundigen Rat, die Unterstützung sowie die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Familie und Lucas für die verständnisvolle Unterstützung und Motivation danken.